

Molekulare Interaktion des *Legionella* Mip-Proteins  
mit Collagen IV und  
Analyse infektionsspezifischer Wirtsfaktoren mit  
Hilfe von *Dictyostelium discoideum*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Can Murat ÜNAL  
aus Bursa, Türkei

1. Referent:	Prof. Dr. Michael STEINERT
2. Referent:	Prof. Dr. Stefan DÜBEL
eingereicht am:	29.05.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	28.07.2009
Druckjahr	2010

## DANKSAGUNG

Sehr herzlich möchte ich mich bedanken bei Prof. Dr. Michael STEINERT für die vielseitige Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und die moralische Unterstützung während dieser Zeit.

Prof. Dr. Dr. h.c. Jörg HACKER danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Molekulare Infektionsbiologie, einer Umgebung vielseitiger Infektionsforschung.

Bei Prof. Dr. Stefan DÜBEL möchte ich mich sehr herzlich für die kurzfristige Zusage als zweiter Referent bedanken.

PD Dr. Heike BRUHN danke ich dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir seit meinem F2-Praktikum die hinterfragende Auseinandersetzung mit Problemen des wissenschaftlichen Alltags nahegebracht hat.

Bei Prof. Dr. Angelika NOEGEL, PD Dr. Ludwig EICHINGER, M.Sc. Lorna MOLL und Dr. Maria SHINA von der Universität zu Köln, Prof. Dr. Gunther FISCHER, Dr. Matthias WEIWAD und Dipl. Biol. Alexandra THIELE von der Max-Planck-Forschungsstelle für die Enzymologie der Proteinfaltung aus Halle, sowie bei Prof. Dr. Cornelius FABER und Dipl. Phys. Kai SCWEDHELM von der Universität Würzburg möchte ich mich für die vielseitigen und erfolgreichen Kooperationen bedanken.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie, die für jede Menge Spaß am Arbeitsplatz gesorgt haben. Darunter möchte ich meine lieben Kollegen aus den *Legionella*-Gruppen; Johannes („Joey“), Sebastian, Frank, Olga, Christiane, Eva, Simone, Matthias, Christopher, Jana und Frederike besonders hervorheben.

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung der mir am nächsten stehenden Personen gar nicht denkbar. Deshalb geht der größte Dank an meine Familie und meine Freundin Deike.

*Aileme*

*Meiner Familie*



I	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....	1
	- ZUSAMMENFASSUNG.....	1
	- SUMMARY .....	3
II	EINLEITUNG.....	5
1	LEGIONELLA PNEUMOPHILA .....	5
1.1	DIE LEGIONÄRSKRANKHEIT .....	5
1.2	BIOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE DER LEGIONELLEN .....	5
1.3	INTRAZELLULÄRER INFEKTIONSZYKLUS VON <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> .....	8
1.4	VIRULENZDETERMINANTEN VON <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> .....	11
1.5	DAS MIP PROTEIN VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> UND SEINE ROLLE IN DER EXTRAZELLULÄREN PATHOGENESE .....	18
2	DER MODELLORGANISMUS <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	22
2.1	PHYLOGENIE UND BIOLOGIE VON <i>D. DISCOIDEUM</i> .....	22
2.2	GENETIK VON <i>D. DISCOIDEUM</i> .....	24
2.3	<i>Dictyostelium discoideum</i> ALS MODELLORGANISMUS DER ZELLBIOLOGIE .....	25
2.4	<i>Dictyostelium discoideum</i> ALS WIRTSMODELLORGANISMUS .....	30
3.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	34
III	MATERIAL und METHODEN.....	35
1	CHEMIKALIEN UND GERÄTE .....	35
1.1	GERÄTE .....	35
1.2	CHEMIKALIEN.....	37
1.3	ANTIBIOTIKA/INHIBITOREN.....	37
1.4	ANTIKÖRPER.....	38
1.5	BAKTERIENSTÄMME .....	39
1.6	ZELL-LINIEN .....	39
2	KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN .....	41
2.1	KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> .....	42
2.2	KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON <i>MYCOBACTERIUM MARINUM</i> .....	42
3	ZELLKULTUR .....	43
3.1	KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	43
3.2	KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i> C3 .....	45
3.3	KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON NCI-H292 LUNGENEPITHELZELLEN.....	46
4	INFEKTIONSSTUDIEN.....	47
4.1	INFEKTION VON <i>Dictyostelium discoideum</i> MIT <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> .....	47
4.2	INFEKTION VON <i>Dictyostelium discoideum</i> MIT <i>MYCOBACTERIUM MARINUM</i> .....	49
4.3	AMÖBENPASSAGE VON <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> CORBY .....	51
4.4	TRANSWELL-ASSAY .....	51
5.	MIKROSKOPISCHE METHODEN .....	53
5.1	FÄRBUNG VON MYCOBAKTERIEN WÄHREND DER INFEKTION.....	53
5.2	RHODAMIN-FÄRBUNG VON OBERFLÄCHEN VON BAKTERIEN .....	54
5.3	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE VON INFIZIERTEN DICTYOSTELIEN.....	54
5.4	LEBENDZELLAUFNAHMEN VON CORONIN7-GFP-MUTANTEN .....	56
6.	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	56
7.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	57
7.1	GELELEKTROPHORESE ZUR EINDIMENSIONALEN AUFTRENNUNG VON PROTEINEN.....	57

7.2	NACHWEIS VON MIP MIT HILFE VON WESTERN-BLOTTING .....	58
7.3	IDENTIFIZIERUNG EINER MIP-BINDUNGSSEQUENZ IN COLLAGEN IV .....	59
7.4	CO-PRÄZIPITATION VON REKOMBINANTEM MIP MIT BIOTINYLIERTEM PEPTID .....	61
7.5	HRP-MARKIERUNG VON REKOMBINANTEM MIP .....	62
7.6	COLLAGEN-BINDUNGSSTUDIEN MIT HRP KONJUGIERTEM MIP .....	62
7.7	PROTEASE-GEKOPPELTE PPIASE-MESSUNG MIT SYNTHETISCH HERGESTELLTEN PEPTIDEN 290/2 UND 291/2 .....	63
IV	ERGEBNISSE.....	66
1.	MOLEKULARE INTERAKTION ZWISCHEN MIP UND HUMANEM COLLAGEN IV .....	66
1.1	IDENTIFIZIERUNG EINER MIP-BINDUNGSSEQUENZ IN COLLAGEN IV .....	66
1.2	NACHWEIS DER BINDUNG ZWISCHEN MIP UND P290 DURCH CO-PRÄZIPITATION .....	70
1.3	MESSUNG DER INHIBITORISCHEN AKTIVITÄT VON P290 AUF DIE PPIASE-AKTIVITÄT VON MIP .....	71
1.4	INHIBITION DER BINDUNG VON MIP AN COLLAGEN IV DURCH P290 .....	72
1.5	AUSWIRKUNGEN VON P290 AUF DIE BAKTERIELLE TRANSMIGRATION .....	73
1.6	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR DES MIP-P290-KOMPLEXES IN LÖSUNG MIT HILFE VON NMR .....	74
1.7	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
2.	DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM ALS WIRTSMODELLORGANISMUS ...	77
2.1	IDENTIFIKATION VON WIRTSFAKTOREN MIT HILFE VON <i>KNOCK OUT</i> -MUTANTEN.....	77
2.1.1	MUTANTEN DES AKTINZYTOSKELETTS.....	77
	- CYCLASE-ASSOZIIERTES PROTEIN (CAP) .....	77
	- CORONIN 7 .....	78
2.1.2	MUTANTEN DES VESIKELTRANSPORTS .....	81
	- DAS LYSOSOM-ASSOZIIERTE PROTEIN LVS B.....	81
	- ATG9 .....	82
2.1.3	WIRTSEIGENE GTPASEN .....	87
	- DG1112 .....	87
	- RACH.....	88
2.1.4	MUTANTEN DES PHOSPHATIDYLINOSITOL-SIGNALWEGES .....	89
	- PHOSPHOLIPASE C.....	89
	- PHOSPHOLIPASE D.....	90
	- PHOSPHATIDYLINOSITOL-4-PHOSPHAT-KINASE .....	91
	- INOSITOL(1,4,5)TRIS-PHOSPHAT-REZEPTOR (IPLA) .....	92
2.1.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
2.2	GEZIELTE MANIPULATION DES pH-WERTES WÄHREND DER <i>LEGIONELLA</i> -INFEKTION BEEINFLUSST DIE REPLIKATION .....	95
2.3	EINFLUSS VON EISENCHELATOREN AUF DIE <i>LEGIONELLA</i> -INFEKTION.....	97
2.4	TRANSKRIPТОMANALYSEN ZUR <i>MYCOBACTERIUM MARINUM</i> -INFEKTION IN <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i> .....	99
2.4.1	INFEKTION VON D. DISCOIDEUM MIT M. MARINUM DSM 44750.....	100
2.4.2	DIE TRANSKRIPTIONELLE ANTWORT VON D. DISCOIDEUM AUF DIE INFEKTION MIT M. MARINUM .....	103
2.4.3	VERGLEICH DER L. PNEUMOPHILA- UND M. MARINUM-INFEKTION .....	107
2.4.4	VERGLEICH DER TRANSKRIPTIONELLEN ANTWORT VON D. DISCOIDEUM AUF DIE INFEKTION VON M. MARINUM R93 UND SEINER ΔPMIA-MUTANTE .....	110
2.4.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
V.	DISKUSSION .....	116

1.	MOLEKULARE INTERAKTION ZWISCHEN MIP UND HUMANEM COLLAGEN IV .....	116
2.	DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM ALS WIRTSMODELLORGANISMUS ..	121
2.1	STUDIEN MIT DELETIONSMUTANTEN .....	121
2.1.1	DAS AKTINZYTOSKELETT UND KLEINE GTPASEN .....	121
	- CYCLASE-ASSOZIIERTES PROTEIN (CAP) .....	121
	- CORONIN 7 .....	122
	- RACH .....	123
2.1.2	VESIKELTRANSPORT, AUTOPHAGIE UND DER PI-METABOLISMUS .....	124
	- LvsB .....	124
	- ATG9 UND AUTOPHAGIE .....	125
	- PHOSPHATIDYLINOSITOL-METABOLISMUS UND AUTOPHAGIE .....	131
2.2	TRANSKRIPТОMANALYSEN ZUR <i>MYCOBACTERIUM MARINUM</i> -INFEKTION IN <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i> .....	135
2.2.1	VERGLEICH VON INFIZIERTEN ZELLEN UND NICHT INFIZIERTEN ZELLEN .....	136
2.2.2	VERGLEICH DER <i>L. PNEUMOPHILA</i> - UND DER <i>M. MARINUM</i> -INFEKTION .....	137
2.2.3	VERGLEICH DER TRANSKRIPTIONELLEN ANTWORT VON <i>D. DISCOIDEUM</i> AUF DIE INFEKTION VON <i>M. MARINUM</i> R93 UND SEINER $\Delta$ PMIA-MUTANTE .....	138
3	AUSBLICK .....	140
VI. LITERATURVERZEICHNIS .....		142
VII. ANHANG .....		167
1.	ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN .....	167
2.	AMINOSÄURESEQUENZEN DER COLLAGEN IV A1- UND A2-ISOFORMEN .....	168
3.	LEBENS LAUF MIT PUBLIKATIONS LISTE .....	169

# I ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

## - Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *Legionella pneumophila* ist der Hauptverursacher der Legionärskrankheit, einer schweren atypischen Pneumonie. Die Bakterien vermehren sich in alveolaren Makrophagen. Während der Infektion wird das Lungengewebe durch Fibrinolyse und Zerstörung der Alveolarräume geschädigt. Das Mip-Protein (**m**acrophage **i**nfectivity **p**otentiator) von *L. pneumophila* ist eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase) der FK506-Klasse, die an humanes Collagen IV bindet und ein wichtiger Virulenzfaktor für die extrazellulären Manifestationen der Legionärskrankheit im Meerschweinchen-Tiermodell ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine spezifische Mip-Bindungssequenz in Collagen IV identifiziert werden. Diese 13 Aminosäuren lange Sequenz befindet sich in der nicht-collagenösen Domäne (NC1) der  $\alpha 1$ -Isoform von Collagen IV. Die Interaktion zwischen Mip und der putativen Bindungssequenz konnte mit Hilfe eines synthetisch hergestellten Peptids (P290) in Kopräzipitationsexperimenten bestätigt werden. P290 konnte zudem die PPIase-Aktivität in einem Protease-gekoppelten Assay auf 50 % reduzieren. Auch die Bindung von Mip an immobilisiertes Collagen IV wurde durch P290 gestört. Außerdem verringerte P290 in *in vitro* Transwell-Experimenten die bakterielle Transmigration über eine Barriere aus Epithelzellen. Außerdem konnte mit Hilfe von NMR die Struktur des Mip-P290-Komplexes in wässriger Lösung ermittelt werden. Die Identifizierung von P290 als die Collagen-Bindungssequenz von Mip ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der molekularen Interaktion der beiden Proteine. Die PPIase-inhibitorische Eigenschaft von P290 weist auf dessen Potential als eine Grundlage für alternative Therapeutika hin, die gegen das extrazelluläre Virulenzpotential von *L. pneumophila* gerichtet sind.

*Dictyostelium discoideum* ist ein etablierter Modellorganismus der Zellbiologie. In dieser Arbeit wurden *Dictyostelium*-Deletionsmutanten in Bezug auf die intrazelluläre *Legionella*-Infektion untersucht. Dafür wurden Mutanten des Zytoskeletts, des endosomalen Verkehrs und im speziellen der Autophagie und

des Phosphatidylinositolmetabolismus verwendet. Während der am häufigsten vorgefundene Effekt die Aufnahmedeffizienz war, konnten in Mutanten des PI-Metabolismus auch bessere *Legionella*-Vermehrungsraten erzielt werden. Darüberhinaus konnte in einer *atg9*-Deletionsmutante gezeigt werden, dass Autophagie in den frühen Infektionsphasen von Bedeutung ist.

Die Annotation des Genoms und ein vorhandenes DNA-Microarray erlauben die Analyse der transkriptionellen Antwort der Dictyostelien auf Infektionen mit intrazellulären Pathogenen. Die Untersuchung der transkriptionellen Antwort von *D. discoideum* auf den Gram-positiven Krankheitserreger *Mycobacterium marinum* ergab, dass die meisten transkriptionellen Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Dictyostelien 24 h nach Infektionsbeginn auftauchen. Gene der Homöostase, des Zellwandmetabolismus und des Vesikeltransports waren in infizierten Dictyostelien gehäuft hochreguliert. Unter den runterregulierten Genen befanden sich Gene des Proteinmetabolismus und *atg16*, das während der Autophagie eine wichtige Rolle spielt. Vergleiche von Infektionen mit einem Wildtyp-Stamm (*M. marinum* R93) und dessen attenuierten Deletionsmutante (*M. marinum* R93  $\Delta$ *pmiA*) ermöglichten die Identifizierung von 17 hoch- und 16 runterregulierten Genen, die spezifisch für virulente *M. marinum* waren. Je 10 dieser Gene waren auch in der Infektion mit virulenten Legionellen differentiell reguliert.

Die Verwendung von Deletionsmutanten hat der Autophagie und dem PI-Metabolismus in der *Legionella*-*Dictyostelium*-Interaktion eine Funktion zugewiesen, die auf humane Makrophagen übertragen werden können. Die Transkriptomanalysen infizierter Dictyostelien geben wichtige Hinweise für die Identifizierung von infektionsrelevanten Wirtsfaktoren und erlauben es, die Infektionsvorgänge unterschiedlicher Krankheitserreger auf molekularer Ebene zu vergleichen.

## - Summary

The Gram-negative bacterium *Legionella pneumophila* is the main causative agent of Legionnaires' disease, a severe form of atypical pneumonia. The bacteria replicate in alveolar macrophages. During infection the lung tissue is severely damaged due to fibrinolysis and destruction of alveolar spaces. The Mip protein of *L. pneumophila* is a member of the FK506-class of peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerases (PPIase) and an important virulence determinant contributing to the extracellular manifestations of the disease in the guinea pig model.

In this study a Mip-specific binding sequence within human Collagen IV was identified. This sequence, 13 amino acids long, is in the non-collagenous region (NC1) of the  $\alpha 1$ -isoform of Collagen IV. In order to perform further studies, a peptide (P290) was chemically synthesized. The interaction between Mip and P290 could be approved by co-precipitation assays. P290 inhibited the PPIase activity of Mip in a protease-coupled PPIase assay. In addition, binding of Mip to immobilized Collagen IV was inhibited by the presence of P290 in a concentration dependent manner. In agreement with these results, P290 was able to inhibit bacterial transmigration in an *in vitro* transwell-assay. In addition, with the help of NMR the solution structure of the Mip-P290-complex was determined. The identification of P290 as the collagen binding sequence of Mip is an important prerequisite for understanding the molecular interaction of both proteins. The PPIase-inhibitory capacity of P290 supports its potential for being a lead structure for alternative therapeutics, which target the extracellular virulence of *L. pneumophila*.

*Dictyostelium discoideum* is an established model organism of cell biology. In this study several deletion mutants of *Dictyostelium* were tested in regard to the infection with *L. pneumophila*. Among them were mutants of the cytoskeleton, the endosomal trafficking, autophagy and the phosphatidylinositol metabolism. The most prominently observed effect was uptake deficiency. However, in several mutants of the PI-metabolism the replication rate of the bacteria was altered, too. Moreover, with the help of a  $\Delta atg9$  mutant it could be shown that autophagy plays a role in the early stages of intracellular infection.

The annotation of the genome and the availability of DNA-microarrays enable the analysis of the transcriptional response of *Dictyostelium* to an infection. Microarray studies of *D. dictyostelium* infected with the gram-positive pathogen *Mycobacterium marinum*, revealed that most of the genes were differentially regulated 24 hours post infection. Among them genes of homeostasis, cell wall metabolism and vesicle trafficking were frequently up regulated. On the other hand genes of protein turnover and *atg16*, a key factor of autophagy, were down regulated. Further, the transcriptional responses of *Dictyostelium* to the infection with a wild type strain (*M. marinum* R93) and its attenuated mutant (*M. marinum* R93  $\Delta$ *pmiA*) allowed the identification of 17 up and 16 down regulated genes which were specific for wild type *M. marinum*. Interestingly, the majority of these genes were differentially regulated in a similar way in the infection with virulent *L. pneumophila*.

Deletion mutants of *D. discoideum* helped to analyze the roles of autophagy and PI-metabolism during the *Legionella*-infection. In the future, these findings can be transferred to the human macrophages. Transcriptome studies delivered important hints for identifying infection related host factors and allow the comparison of the host responses to different pathogens.

## II EINLEITUNG

### 1 *Legionella pneumophila*

#### 1.1 Die Legionärskrankheit

Im Juli 1976 erkrankten zahlreiche Teilnehmer einer Tagung der American Legion Convention in Philadelphia (USA) an einer schweren atypischen Pneumonie. Von 221 erkrankten Teilnehmern starben 34. Im darauf folgenden Jahr gelang es den Erreger in Meerschweinchen zu rekultivieren, der in Anlehnung an das Ereignis *Legionella pneumophila* genannt wurde. Es stellte sich heraus, dass die Krankheitserreger durch die Klimaanlage des Hotels verbreitet worden waren [Fraser et al., 1977, McDade et al., 1977]. Verwandte dieses Erregers wurden bereits Ende der vierziger Jahre isoliert [Fields et al., 2002], und ihre Fähigkeit Amöben zu infizieren war auch in einigen Fällen bereits bekannt [Drozanski, 1956, Brenner et al., 1979, Hookey *et al.*, 1996]. Heutzutage sind 48 Spezies und 70 Serogruppen der Familie Legionellaceae bekannt, die nur aus der Gattung *Legionella* besteht. Zudem werden weitere 12 Spezies, die als *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAP) bezeichnet werden, zu dieser Familie gezählt [Adeleke et al., 2001, Alli et al., 2003].

#### 1.2 Biologie und Epidemiologie der Legionellen

Legionellen sind Gram-negative, monopolar einfach flagellierte Stäbchen mit 2–20 µm Länge, 1 µm Dicke, und werden phylogenetisch den γ-Proteobakterien zugeordnet. Sie leben aerob als Chemoorganotrophe und haben keinen fermentativen Metabolismus. Aminosäuren werden als die eigentliche Kohlenstoff- und Energiequelle betrachtet [George *et al.*, 1980, Tesh und Miller, 1981], wobei neuere Transkriptomstudien die Verwendung alternativer Kohlenstoffquellen durch den Entner-Doudoroff-Weg während der Infektion nahe legen [Brüggemann *et al.*, 2006, Jules und Buchrieser, 2007]. Für die Kultur im Labor muss ein gepuffertes Medium verwendet werden, das mit L-Methionin, L-Serin und L-Cystein als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen ergänzt wird sowie mit Aktivkohle (Festmedium) versetzt ist, um Radikale abzufangen. Die Zugabe von Eisen erhöht zusätzlich das Wachstum *in vitro*



[Feeley *et al.*, 1978, Warren und Miller, 1979]. Die optimalen Wachstumstemperaturen liegen zwischen 25 und 42 °C.

Legionellen kommen ubiquitär in Süßwasser und feuchten Böden vor [Fliermans *et al.*, 1981, Ruehlemann und Crawford, 1996, Atlas, 1999], wo sie Amöben oder Ciliaten parasitisieren. In ihrem Habitat können sie sowohl pelagisch als auch mit Biofilmen assoziiert sein [Rogers und Keevil, 1992]. Biofilme sind für die Ökologie der Legionellen von besonderer Bedeutung, da sie nicht nur Schutz vor Stressfaktoren wie z.B. Antibiotika oder Desinfektionsmaßnahmen wie Chlorbehandlung bieten. Biofilme sind auch attraktive Nahrungsquellen für frei lebende Protozoen, auf die die Legionellen als fakultativ intrazelluläre Parasiten angewiesen sind [Rowbotham, 1980, Murga *et al.*, 2001, Alleron *et al.*, 2008]. Biofilme helfen den Legionellen auch während der effizienten Besiedlung von Wassersystemen, in denen sie sich unter günstigen Bedingungen stark vermehren können [Borella, 2005]. Durch die terminalen Auslässe, wie Sprinkleranlagen oder Klimageräte, die Legionellen-haltige Aerosole bilden, können die Bakterien anschließend über die Atemwege auf den Menschen übertragen werden [Fields *et al.*, 2002]. Im Menschen führt eine Infektion mit Legionellen zu einer atypischen Pneumonie, der Legionärskrankheit, deren klinische Diagnose und Unterscheidung von anderen Pneumonien sehr schwer ist [Edelstein, 1993]. Die häufigsten Symptome sind Fieber, Kopfschmerzen, trockener Husten, Kopf- und Muskelschmerzen und gelegentlich Diarrhö [Tsai *et al.*, 1979]. In schlimmen Fällen kann ein Multisystemversagen ausgelöst werden, das häufig mit dem Tod endet [Fraser *et al.*, 1977]. Zur Risikogruppe gehören immunsupprimierte oder Transplantations-Patienten, Patienten mit lang andauernder Kortison-Behandlung, Alkoholiker, Raucher und Menschen mit einem hohen Lebensalter, wobei Männer häufiger als Frauen erkranken [Breiman and Butler, 1998, Marston *et al.*, 1994].

Die Infektion des Menschen beruht in erster Linie auf der Fähigkeit der Legionellen, alveolare Makrophagen (MΦ) zu infizieren, und sich in diesen effizient vermehren zu können [Horwitz und Silverstein, 1980, Fields *et al.*, 2002]. Da bis heute keine Mensch-zu-Mensch-Übertragung dokumentiert worden ist, wird der Mensch nicht als ein natürlicher Wirt von Legionellen betrachtet. Die Infektion des Menschen gelingt wegen der zellbiologischen

Ähnlichkeiten zwischen den frei lebenden Protozoen und den humanen MΦ [Fields, 1996, Steinert *et al.*, 2002]. Das Robert-Koch-Institut geht davon aus, dass in Deutschland etwa 4 % aller ambulant auftretenden Pneumonien durch Legionellen verursacht werden. Dies entspricht etwa 20.000 Fällen pro Jahr. Die Letalität unter den in Deutschland registrierten *Legionella*-Fällen lag im Jahr 2006 mit 7,4 % im europäischen Durchschnitt [RKI, Epidemiologisches Bulletin Nr.50], und spiegelt die relativ hohe Letalitätstrategie trotz vorhandener Medikation mit Makrolid-Antibiotika (wie Erythromycin), Rifampin oder Tetrazyklinen [Cunha, 2008]. Eine weitere Krankheit, die mit Legionellen assoziiert ist, ist das 1968 beschriebene Pontiac-Fieber. Die Symptome sind Grippe-ähnlich aber vergehen nach einigen Tagen von selbst. Obwohl die Patienten eine Serokonversion gegen *Legionella*-Antigene vollziehen, gelang keine Kultivierung von Legionellen aus infizierten Individuen [Glick *et al.*, 1978, Kaufmann *et al.*, 1981].

Etwa die Hälfte der beschriebenen *Legionella*-Spezies ist im Zusammenhang mit der Legionärskrankheit isoliert worden. Dennoch ist in 90 % der identifizierten Fälle die Art *L. pneumophila* der Auslöser. Unter diesen ist die Serogruppe 1 für 79 % der Fälle verantwortlich, und sticht deutlich aus den restlichen 14 Serogruppen hervor [Marston *et al.*, 1994]. Eine Ausnahme stellt lediglich die Art *L. longbeachae* dar, die in Australien eine dominante Rolle in der Epidemiologie dieser Krankheit spielt [Steele, 1989]. Für *L. pneumophila* sind 14 Amöben- und zwei Ciliatenarten als natürliche Wirte aus Süßwasser und feuchten Böden beschrieben [Rowbotham, 1980, Fields, 1996]. Unter Laborbedingungen hingegen erwies sich ein breites Spektrum von Zellen, darunter humane Zell-Linien von Monozyten [Horwitz und Silverstein, 1980], MΦ-ähnlichen U937-Zellen [Pearlman, 1988], embryonalen Lungenfibroblasten [Wong *et al.*, 1980], HeLa-, Hep2- und McCoy-Zellen [Daisy *et al.*, 1981], die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* [Hägele *et al.*, 2000, Solomon *et al.*, 2000] sowie Kc67-Zellen von *Drosophila melanogaster* [Dorer *et al.*, 2006] als geeignete Wirte. Im Menschen sind die alveolaren MΦ und Monozyten die primär von *L. pneumophila* parasitierten Zellen, aber auch in Typ I und Typ II Lungenepithelzellen können die Bakterien sich vermehren [Mody *et al.*, 1993, Cianciotto *et al.*, 1995].

### 1.3 Intrazellulärer Infektionszyklus von *Legionella pneumophila*

Die Infektion der frei lebenden Protozoen und humanen alveolaren MΦ verläuft in ihren Grundzügen ähnlich ab, wobei auch Unterschiede auftauchen (Abb. 1). So wird die Aufnahme von *L. pneumophila* in die Amöbe *Hartmannella vermiformis* durch ein Galaktose/N-Acetylgalaktosamin-(Gal/GalNAc)-bindendes Lektin vermittelt [Venkataraman *et al.*, 1997]. Die Aufnahme in die MΦ hingegen kann sowohl über einen Komplex aus CR1 und CR3 (complement receptor) geschehen [Payne und Horwitz, 1987, Bellinger-Kawahara und Horwitz, 1990] als auch ohne Opsonisierung stattfinden [Tachado *et al.*, 2008]. Das Zielmolekül auf der Bakterienoberfläche ist für keinen der Fälle bekannt. Es konnte lediglich für das 25 kDa MOMP (major outer membrane protein) gezeigt werden, dass es die Bindung an U937-Zellen unterstützt [Krinos *et al.*, 1999]. Für die Aufnahme ist auf jeden Fall ein intakter *dot/icm*-Apparat, ein Typ IVB-Sekretionssystem, notwendig [Watarai *et al.*, 2001, Fields *et al.*, 2002]. Außerdem wird während der Aufnahme sowohl bei Amöben als auch bei MΦ häufig die Coiling-Phagozytose beobachtet, bei der sich ein Filopodium mehrfach um das Bakterium wickelt [Horwitz, 1984, Bozue und Johnson, 1996]. Der Grund für dieses Phänomen ist ebenfalls ungeklärt.

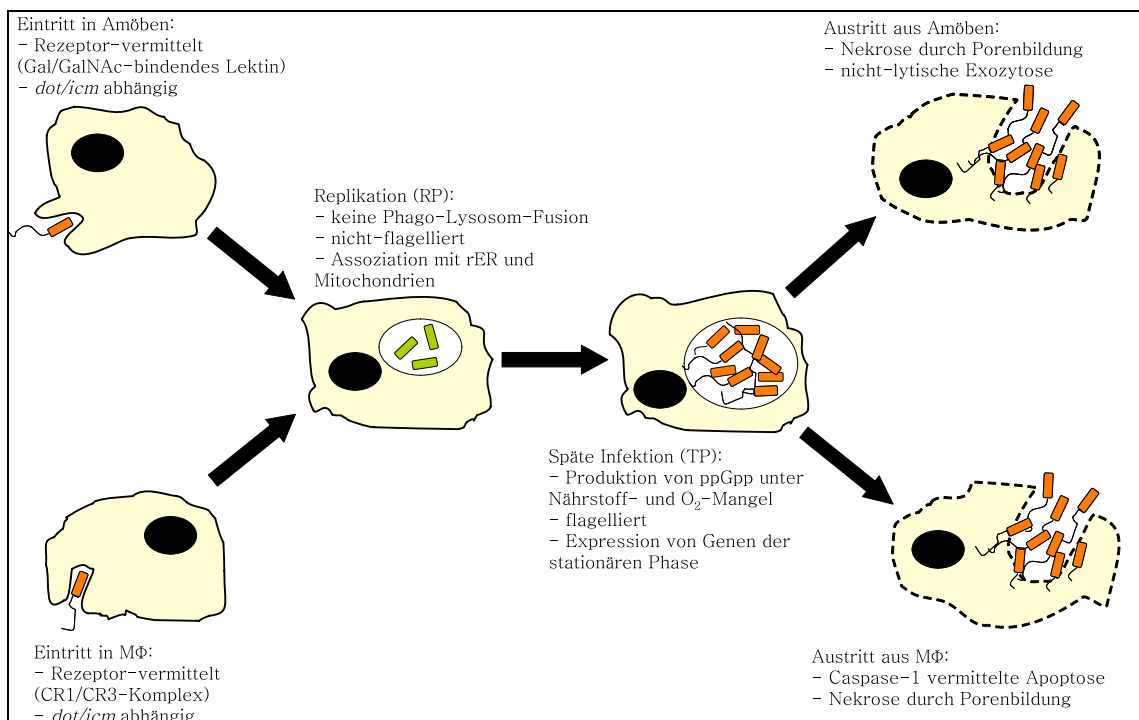
Nach der Aufnahme ist *L. pneumophila* in der Lage, in den Reifungsprozess des Phagosoms einzugreifen und die Ansäuerung sowie die Fusion mit Lysosomen zu unterbinden [Horwitz 1983a und b, Horwitz und Maxfield, 1984]. Auf molekularer Ebene äußert sich dieser Vorgang durch den Ausschluss von typischen Markern der späten Endosomen (LAMP1 und 2, Rab7, vakuoläre ATPase), sowie der Lysosomen (CathepsinD) [Swanson und Hammer, 2000]. Anschließend findet eine Assoziation mit dem rauen endoplasmatischen Reticulum (rER) und mit Mitochondrien statt [Swanson und Isberg, 1995, Abu Kwaik, 1996]. Die Membran des Phagosoms erlangt im Laufe der Infektion sogar ER-ähnliche Proportionen [Tilney *et al.*, 2001], sodass gar eine Fusion mit dem ER des Wirtes nicht auszuschließen ist [Robinson und Roy, 2006]. Es wird angenommen, dass die enge Assoziation mit dem rER und Mitochondrien den Bakterien ermöglicht, Nährstoffe der Wirtszelle zu mobilisieren. In dieser

durch bakterielle Manipulation entstandenen Nische findet die Replikation statt. Interessanter Weise verliert das *Legionella*-haltige Phagosom mit fortschreitender Infektion ihre vorherigen Eigenschaften und eine Ansäuerung wird beobachtet. Diese Veränderung dient womöglich auch als Signal für die Bakterien, den Ausbruch aus der Wirtszelle vorzubereiten und die Infektion weiterer Wirtszellen zu ermöglichen [Sturgill-Koszycki und Swanson, 2000, Swanson und Fernandez-Moreia, 2002].

Der Ausbruch aus MΦ wird in den frühen Phasen der Infektion durch Caspase-1 vermittelte Apoptose ermöglicht [Hägele *et al.*, 1998, Gao und Abu Kwaik, 1999] kann aber auch mittels Nekrose durch Poren bildende Aktivitäten zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden [Alli *et al.*, 2000]. Neuere Studien haben gezeigt, dass die Flagellenuntereinheit, Flagellin, von dem NLR (NOD-like receptor) Ipaf der Wirtszellen erkannt wird und zusammen mit einem Inflammasom die Aktivierung von Caspase-1 durchführt [Amer *et al.*, 2006, Coers *et al.*, 2007]. Die Apoptose wird auch immer mehr als ein Abwehrmechanismus der infizierten Zellen betrachtet, die durch den programmierten Zelltod den Legionellen ihre Lebensgrundlage entziehen [Vinzing *et al.*, 2008]. Bei Protozoen konnten keine Apoptose-ähnlichen Vorgänge beobachtet werden. Hier wird eher eine Nekrose bedingte Lyse der Wirtszellen als Ausbruchsmechanismus vermutet [Hägele *et al.*, 1998, Gao und Abu Kwaik, 2000]. Aber auch nicht-lytische Vorgänge werden für die Freisetzung aus Protozoen angenommen, bei denen die Bakterien Exozytosemechanismen des Wirtes verwenden. Dies konnte an Hand von Deletionsmutanten gezeigt werden, die die Effektoren LepA und LepB nicht mehr herstellen konnten. Diese Mutanten hatten keinen Einfluss auf die Cytotoxizität, konnten aber dennoch in Membran-gebundenen Kompartimenten außerhalb der Zellen nachgewiesen werden [Chen *et al.*, 2004].

Der Verlauf der Infektion spiegelt den biphasischen Lebenszyklus von Legionellen wider. In der frühen Phase, in der die Legionellen ihren Wirt dahingehend manipulieren, dass sie sich effizient vermehren können, sind sie nicht flagelliert, Na<sup>+</sup>- und pH-resistent, sowie weisen kein β-Hydroxybutyrat auf, und sie befinden sich in der replikativen Phase (RP) [Rowbotham, 1986]. Mit fortschreitender Vermehrung verursacht die Verknappung der Nährstoffe und des Sauerstoffs im Phagosom die Bildung des Alarmons ppGpp (Guanosin-

3',5'-bispyrophosphat) [Hammer und Swanson, 1999]. Die Bakterien verlangsamen ihre Vermehrungsrate und exprimieren Gene, die ihnen ermöglichen in die transmissive Phase (TP) überzugehen. Nun bilden die Bakterien Flagellen, sind  $\text{Na}^+$ - und pH-sensitiv und bilden den Speicherstoff  $\beta$ -Hydroxybutyrat [Rowbotham, 1986, Brüggemann *et al.*, 2006]. Bakterien der transmissiven Phase sind virulent im Gegensatz zu den avirulenten Bakterien der replikativen Phase [Byrne und Swanson, 1998, Molofsky und Swanson, 2004].



**Abb. 1: Der zelluläre Infektionszyklus von *Legionella pneumophila*.**

Motile Bakterien werden von ihren natürlichen Wirten, den Protzoen, oder den MΦ aufgenommen. Dieser Prozess benötigt einen intakten Dot/Icm-Apparat, ein Typ IVB-Sekretionssystem. Die Aufnahme ist Rezeptor vermittelt, wobei die Aufnahme durch MΦ auch unabhängig vom Komplementsystem ablaufen kann. Nach der Aufnahme verhindern die Legionellen die Phago-Lysosom-Fusion mit Hilfe des Dot/Icm-Systems und vermitteln die Assoziation des Phagosoms mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) und den Mitochondrien. In dieser replikativen Phase (RP) sind die Bakterien nicht flagelliert. Nach Beendung der replikativen Phase wird unter Nährstoff- und  $\text{O}_2$ -Mangel der „stringent response“ ausgelöst, der zur Bildung des Alarmons ppGpp führt, und die transmissive Phase (TP) einläutet. Die Bakterien bilden wieder Flagellen und verursachen die Apoptose oder Nekrose bedingte Lyse der Wirtszelle. In Amöben ist auch ein Exozytose-ähnlicher Austritt beschrieben. (Abgewandelt nach Fields *et al.*, 2002)

## 1.4 Virulenzdeterminanten von *Legionella pneumophila*

Inzwischen sind die Genomsequenzen von vier unterschiedlichen Epidemie-assoziierten *L. pneumophila*-Stämmen der Serogruppe 1 vollständig. Es handelt sich hierbei um den Philadelphia-1 Stamm, der für den Ausbruch im Jahr 1976 verantwortlich ist [Chien *et al.*, 2004], die Stämme Lens und Paris, die Epidemien in Frankreich auslösten [Cazalet *et al.*, 2004], sowie den Stamm Corby, ein Patientenisolat aus England [Fitzgeorge *et al.*, 1983, Steinert *et al.*, 2007]. Die Genome sind in etwa gleich groß (3,35 Mbp in *L. pneumophila* Lens gegenüber 3,6 Mbp in *L. pneumophila* Corby) und weisen mit ca. 38 % einen ähnlichen GC-Gehalt auf. Alle beherbergen etwa 3.000 Protein kodierende Gene mit einer konservierten Genomorganisation. Die Stämme Lens und Paris besitzen zusätzlich Plasmide (60 bzw. 132 kb). Trotz dieser Ähnlichkeiten sind 10 % der Gene Stamm-spezifisch, die größtenteils für Proteine ohne bekannte Funktionen kodieren. Da aber unter den mit bekannten Funktionen auch Regulatoren der GGDEF/EAL-Klasse, Ankyrin-repeat Proteine und einige Restriktionsmodifikationssysteme vorkommen, wird angenommen, dass diese Stamm-spezifischen Gene für die Besiedlung von unterschiedlichen Nischen durch die einzelnen Stämme wichtig sind [Jules und Buchrieser, 2007]. Als ein Umweltpathogen mit einem breiten Wirtsspektrum, besitzt *L. pneumophila* eine Vielzahl von Virulenzdeterminanten (Tab. 1), die stammübergreifend im Genom vorliegen [Cazalet *et al.*, 2008].

Die Abhängigkeit von Eisen als essentielles Spurenelement hat zur Folge, dass die Legionellen viele Eisen-rekrutierende Faktoren besitzen. Darunter ist Legiobactin, ein neuartiges Siderophor [Liles *et al.*, 2000], aber auch ein Hydroxamat-artiges Pneumobactin, sowie ein Pyroverdin-artiges Siderophor [Hickey und Cianciotto, 1997, Viswanathan und Cianciotto, 2002]. Zudem besitzen die Legionellen ein Eisenaufnahmesystem (*iraA/B*) und ein Cytochrom-C-Biosynthesystem (*ccmC*), das für die Metabolisierung des aufgenommenen Eisens benötigt wird [Pope *et al.*, 1996, Viswanathan *et al.*, 2000, Viswanathan und Cianciotto, 2002]. Die Eisenaufnahmesysteme stehen unter der Kontrolle des Eisen-abhängigen Regulators Fur [Hickey und Cianciotto, 1994 und 1997].

*L. pneumophila* besitzt einige detoxifizierende Enzyme wie Superoxid-dismutasen (SOD), die teilweise essentiell sind [St. John und Steinman, 1996, Sadosky *et al.*, 1994] und auch Katalasen (*katA* und *katB*), die für die intrazelluläre Infektion von Bedeutung sind [Amemura-Maekawa *et al.*, 1999, Bandyopadhyay und Steinman, 1998 und 2000].

Tab. 1: Überblick über die wichtigsten Virulenzdeterminanten von *Legionella pneumophila* und deren Funktion (erstellt an Hand von Cianciotto, 2001).

Virulenzdeterminante(n)	Funktion
<i>iraA/B</i> , <i>ccmC</i> , Legiobactin, <i>fur</i>	Eisenkomplexierung und -Aufnahme
<i>katA/B</i> , SODs	Detoxifikation von Sauerstoffradikalen
Phospholipase A ( <i>plaB</i> ), Phospholipase C ( <i>plcA</i> ), Lipasen ( <i>lipA/B</i> )	Hydrolyse von extrazellulären Lipiden und Phospholipasen, evtl. Schutz gegen Surfactant
Zn <sup>2+</sup> -Metalloproteasen	Hydrolyse von extrazellulärem proteinösem Material und Gelatine
Typ IV-Pilus	Intrazelluläre Virulenz und Kolonisation von Meerschweinchen
Typ II-Sekretion ( <i>lsp</i> -Operon)	Sekretion von degradierenden Enzymen (Lipasen, Proteasen, Phospholipasen), sowie Typ IV-Pili Bildung
Typ IVA-Sekretion ( <i>trb/tra</i> )	Konjugation und Austausch von genetischem Material
Typ IVB-Sekretion ( <i>dot/icm</i> )	Sekretion von Effektoren in die Wirtszelle, intrazelluläre Vermehrung
LPS	Phasenvarianz gekoppelt mit Virulenz
Flagelle ( <i>flaA</i> )	Motilität, Verbesserung der Aufnahme durch Wirtszellen
Äußere Membran Vesikel	Intrazelluläre Vermehrung, evtl. Transport von extrazellulären Virulenzfaktoren

Viele sekretierte, degradierende Enzyme helfen den Legionellen Energie- und Kohlenstoffquellen in ihrer Umwelt zu mobilisieren. Darunter befinden sich Typ A und C Phospholipasen, Lysophospholipasen, Lipasen [Aragon *et al.*, 2000, Flieger *et al.*, 2000a und b, 2001], eine  $\text{Zn}^{2+}$ -Metalloprotease [Quinn und Tompkins, 1989, Hales und Shuman, 1999]. Die Sekretion dieser Enzyme ins Äußere wird durch das Typ II-Sekretionssystem (*lsp*-Operon) durchgeführt [Hales und Shuman, 1999, Aragon *et al.*, 2000]. Obwohl die Deletion des Sekretionssystems die intrazelluläre Virulenz von *L. pneumophila* deutlich reduziert, konnte keinem der sekretierten Substrate eine ähnliche wichtige Rolle zugewiesen werden [Hales und Shuman, 1999, Polesky *et al.*, 2001, Rossier und Cianciotto, 2001], was auf eine synergetische Wirkung einiger Typ II sekretierter Substrate hindeuten könnte. Eine weitere Virulenzdeterminante, die von dem *lsp*-System abhängig auf der Bakterienoberfläche exprimiert wird, sind die Typ IV Pili [Stone und Abu Kwaik, 1998]. Für die Typ IV-Pili konnte gezeigt werden, dass sie die intrazelluläre Vermehrung, sowie die Besiedlung von Biofilmen in Abwesenheit von Protozoen begünstigen. Auch die Virulenz in Tiermodellen nahm drastisch ab [Liles *et al.*, 1999, Rossier und Cianciotto, 2001, Lucas *et al.*, 2006].

*L. pneumophila* besitzt zwei Typ IV-Sekretionssysteme. Das Typ IVA-System (*trb/tra* in *L. p.* Corby, *lvh* in *L. p.* Lens, Paris und Philadelphia-1) ist ein DNA-Konjugationssystem, das den horizontalen Gentransfer zwischen *Legionella pneumophila*-Stämmen oder anderen Spezies ermöglichen kann [Glöckner *et al.*, 2007]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Bereiche auf genomischen Inseln vorliegen. Sie können aus dem Chromosom entfernt und zirkularisiert werden. Da sie ein *oriT* besitzen, ist auch die extrachromosomale Replikation dieser Elemente sowie die Übertragung auf Akzeptorstämme über Konjugation möglich [Doleans *et al.*, 2004, Glöckner *et al.*, 2007]. Für das *lvh*-System wurde ein Zusammenhang mit der Verbreitung von *L. pneumophila* in der Umwelt hergestellt [Bandyopadhyay *et al.*, 2007].

Das Dot/Icm-Sekretionssystem (**d**efect in **o**rganelle **t**rafficking/**i**ntracellular **m**ultiplication) ist die wichtigste Virulenzdeterminante von *Legionella pneumophila*. Mutationen, die die Expression oder Funktion der Sekretionsmaschinerie stören, führen zum kompletten Verlust der



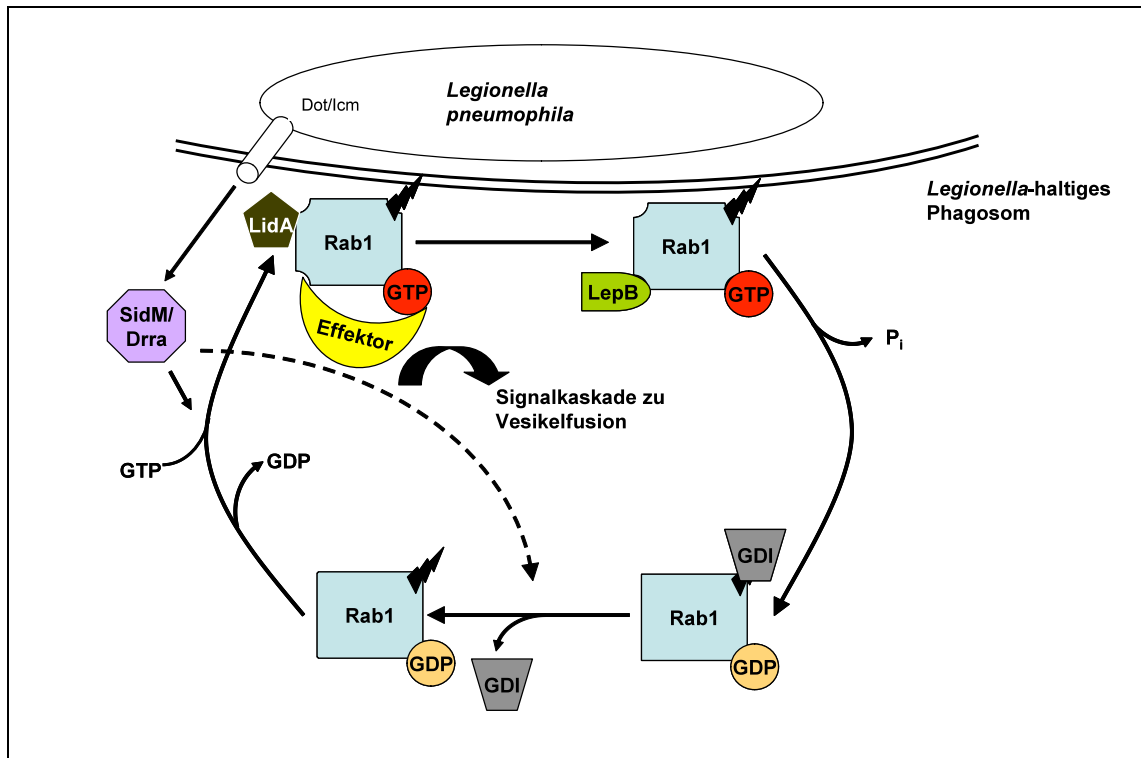
intrazellulären Virulenz [Marra *et al.*, 1992, Berger und Isberg, 1993]. Es handelt sich bei Dot/Icm um ein TypVIB-Sekretionssystem, deren Genstruktur den IncI Plasmiden wie dem R64 von *Salmonella typhimurium* verwandt ist, welches für ein Konjugationssystem kodiert [Komano *et al.*, 2000]. Obwohl dem Dot/Icm System die Fähigkeit DNA-Transfer durchzuführen zugeschrieben wird [Vogel *et al.*, 1998, Segal und Shuman, 1998], ist die Rolle einer möglichen Konjugation nicht klar. Die bis dato verifizierten Substrate des Dot/Icm-Systems sind Proteine, die erst nach der Aufnahme hergestellt und in die Wirtszelle sekretiert werden [Brüggemann *et al.*, 2006]. Die Expression der Gene wird durch zwei Zweikomponentensysteme (PmrAB und CpxRA) kontrolliert deren Regulatoren PmrA und CpxR typische helix-turn-helix DNA-bindende Faktoren sind [Zusman *et al.*, 2007, Altman und Segal, 2008].

Obwohl viele Dot/Icm-sekretierte Effektoren bekannt sind, sind deren Ziele in der Wirtszelle und ihre Rolle während der Infektion in den meisten Fällen nicht endgültig geklärt. Auch die Deletion eines Effektors führt nicht immer zu einer deutlichen Attenuation der Virulenz wie im Falle einer funktionellen Störung des Sekretionsapparates. Dies liegt womöglich an dem breiten Wirtsspektrum von *L. pneumophila*, das zur Entstehung orthologer, wirtsspezifischer Effektoren geführt haben kann [Ninio und Roy, 2007]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass im *Legionella*-Genom 127 putative Dot/Icm-Substrate kodiert sind. Die heterologe Expression in Hefe erzeugte im Falle von 79 dieser 127 Effektoren einen Wachstumsdefekt, der bei 27 auf die Störung des endosomalen Vesikeltransports zurückzuführen war [Heidtman *et al.*, 2009].

Außerdem sind auch viele Wirtsprozesse, wie z.B. der endosomale Vesikeltransport, die bei der *Legionella*-Infektion eine Rolle spielen, redundant bzw. können das gleichzeitige Einwirken mehrerer Effektoren benötigen [Dorer *et al.*, 2006]. Bisher wurden die kleinen GTPasen Rab1 und Rab5, Arf1 und das Vesikelfusionsprotein Sec22, eine Chaperone-ähnliche ATPase Cdc48/p97 als Wirtsproteine identifiziert, die von *Legionella*-sekretierten Effektoren zum *Legionella*-haltigen Phagosom rekrutiert oder in ihrer Aktivität beeinflusst werden [Dorer *et al.*, 2006, Machner und Isberg 2006 und 2007, Ingmundson *et al.*, 2007]. Einer der sekretierten *Legionella*-Effektoren ist RalF, der eine Eukaryonten-ähnliche Sec-7 Domäne besitzt und als ein GEF (**g**uanine

nucleotide **e**xchange **f**actor) agiert. Es wurde gezeigt, dass RalF früh in der Infektion in die Wirtszelle sekretiert wird und dort sowohl für die Aktivierung von Arf1 (**A**DP-**r**ibsylation **f**actor) als auch für dessen Rekrutierung an die Membran des *Legionella*-haltigen Phagosoms sorgt [Nagai *et al.*, 2002, Amor *et al.*, 2005].

Die Rekrutierung der kleinen GTPase Rab1 durch sekretierte Effektoren wurde in mehreren Arbeiten untersucht und zeigt, wie sehr die zeitliche und räumliche Manipulation von Wirtsproteinen durch *L. pneumophila* ausgereift ist (Abb. 2). Die Dot/Icm-Substrate SidM/DrrA sowie LidA und LepB sind in der Lage Rab1 zu binden [Machner und Isberg 2006, Murata *et al.*, 2006, Ingmundson *et al.*, 2007]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass SidM/DrrA als ein GEF funktioniert und somit zur Aktivierung des im Zytoplasma vorliegenden Rab1 beiträgt. Das GTP-gebundene Rab1 wird von LidA an die Membran des *Legionella*-haltigen Phagosoms rekrutiert und verursacht womöglich die Lokalisation weiterer wirtseigener Proteine. Dadurch werden Signalkaskaden aktiviert und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts verursacht, was wiederum den endosomalen Vesikeltransport beeinflusst [Machner und Isberg 2007, Ingmundson *et al.*, 2007]. Die frühzeitige Rekrutierung von Rab1 ist wichtig für die Herstellung der *Legionella*-freundlichen Nische, da die Ansäuerung des Phagosoms und die Fusion mit Lysosomen im Rahmen der Wirtsabwehrmechanismen unterbunden werden können. Ein später in der Infektion sekretierter Effektor, LepB, bindet an das zuvor rekrutierte Rab1 und aktiviert dieses, sodass es die Hydrolyse von GTP zu GDP vollzieht, sich wieder von der Membran ablöst und in die inaktive Form übergeht [Ingmundson *et al.*, 2007]. Das somit als ein GAF (**G**TPase **a**ctivating **f**actor) agierende LepB sorgt für die Fortsetzung des Infektionszyklus' und leitet zusammen mit LepA den Ausbruch aus der Wirtszelle ein [Chen *et al.*, 2004].



**Abb. 2: Manipulation der Rab1-GTPase durch sekretierte *Legionella*-Effektoren.**

Das *dot/icm*-Substrat SidM/DrrA wird früh in der Infektion in die Wirtszelle sekretiert, wo es das zytoplasmatische Rab1-GDP rekrutiert und den Austausch von GDP gegen GTP katalysiert. Rab1-GTP wird mit Hilfe von LidA, einem weiteren sekretierten Effektor, an die Membran des *Legionella*-haltigen Phagosoms lokalisiert und ermöglicht die Rekrutierung weiterer Rab1-abhängiger Wirtsfaktoren. Diese lösen Signalkaskaden aus, die den endosomalen Vesikeltransport beeinflussen, sodass keine Ansäuerung und keine Fusion mit Lysosomen stattfinden. Das später sekretierte LepB aktiviert die GTPase-Funktion von Rab1, woraufhin GTP hydrolysiert wird, und das inaktive Rab1-GDP von der Membran abfällt. Der zytosolische Vorrat an Rab1-GDP wird durch wirtseigene GDIs (GDP dissociation inhibitor) aufrechterhalten.

Weitere Effektoren, denen Funktionen zugeordnet werden können, sind SidJ, das während der Rekrutierung des rERs eine Rolle spielt, und SidF, das verhindert, dass die Wirtszelle durch Apoptose vorzeitig abstirbt und eine Vermehrung der Legionellen verhindert [Liu und Luo, 2007, Banga *et al.*, 2007]. Ein Paralog der SidE-Proteinfamilie, LaiA (SdeA), ist in die Adhäsion an und Invasion in humane Alveolarzellen involviert [Chang *et al.*, 2005].

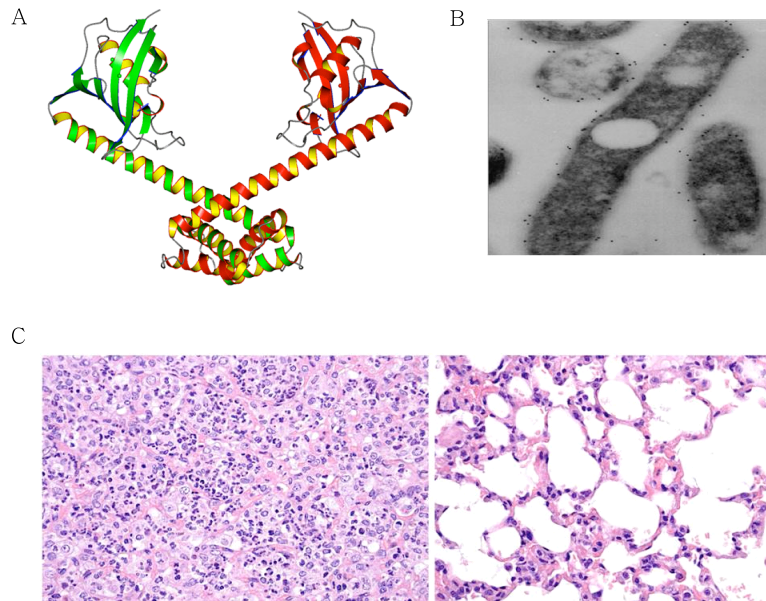
Unter den Dot/Icm-Substraten sind einige mit Eukaryonten-ähnlichen Proteindomänen. Ein Beispiel dafür sind fünf sekretierte Effektoren, die eine Sel-1 Domäne besitzen [Newton *et al.*, 2007]. Proteine mit einer Sel-1 Domäne sind in Prozesse wie Proteinabbau im ER beteiligt [Hampton *et al.*, 1996] und in *Ceanorhabditis elegans* ist ein Sel-1-Protein ein negativer Regulator der

Notch-Signalwege [Grant und Greenwald, 1996]. Ihre genauen Funktionen sind jedoch noch unklar. Aus den fünf Sel-1 Proteinen von *L. pneumophila* konnte für EnhC eine Beteiligung an der Aufnahme und Vermehrung in aktivierten in MΦ [Cirillo *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2008] nachgewiesen werden. LidA, unterstützt die Inhibition der Phagolysosombildung (siehe oben) [Conover *et al.*, 2003]. Zwei weitere, LpnE und LidL, greifen in den endosomalen Vesikeltransport im Wirt ein [Newton *et al.*, 2007]. Es wird angenommen, dass die Eukaryonten-ähnlichen Domänen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen bakteriellen Effektoren und Wirtsproteinen ermöglichen, sodass die Wirtszelle manipuliert werden kann. Dies konnte kürzlich an Hand eines U-Box-haltigen *Legionella*-Effektors gezeigt werden, der auch über das Dot/Icm-System in die Zellen sekretiert wird. F- und U-Box-Proteine sind in Eukaryonten an der Ubiquitinierungs-abhängige Degradation von Proteinen beteiligt [Bai *et al.*, 1996, Aravind und Koonin, 2000]. Das U-Box-haltige *Legionella*-Protein LubX wird während der Infektion in die Wirtszelle sekretiert und verursacht die Polyubiquitinierung von Clk1 (Cdc2-like kinase 1), wobei die Bedeutung dieses Ereignisses für die Infektion noch unklar ist [Kubori *et al.*, 2008]. Die Liste der Proteine mit Eukaryonten-ähnlichen Domänen kann über die eindeutigen Dot/Icm-Substrate hinaus erweitert werden. Darunter sind Proteine mit Ankyrin-Domänen, zwei Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (ecto-NTDPase), eine Sphingosin-1-phosphatlyase sowie eine Glukoamylase, deren Expression im Wirt hochreguliert wird [Brüggemann *et al.*, 2006, Jules und Buchrieser, 2007, Sansom *et al.*, 2007].

### 1.5 Das Mip Protein von *L. pneumophila* und seine Rolle in der extrazellulären Pathogenese

Das Mip Protein wurde in einer Studie identifiziert, in der mehrere Oberflächenantigene von *Legionella pneumophila* durch homologe Rekombination deletiert wurden. Die Deletion eines dieser führte zu einer erheblichen Attenuation in U937-Zellen und wurde daher *mip* (**m**acrophage **i**nfectivity **p**otentiator) genannt [Cianciotto *et al.*, 1989]. Später stellte sich heraus, dass die Deletion auch in Amöben und im Tiermodell zur Reduzierung der Infektiosität führt [Cianciotto *et al.*, 1990, Cianciotto und Fields, 1992, Wintermeyer *et al.*, 1995].

Mip ist ein basisches (pI 9,8) 25 kDa Protein mit einer PPIase-(**p**eptidyl-**p**rolyl-**cis/trans**-**i**somerase) Aktivität. Es besitzt eine N-terminale 20 Aminosäuren lange Signalsequenz, die während des Transports abgespalten wird, sodass das reife, Membran-lokalisierte Protein eine Masse von 22,8 kDa aufweist. [Wintermeyer *et al.*, 1995, Helbig *et al.*, 1995 und 2001]. Eine Kristallstruktruanalyse mit einer Auflösung von 2,4 Å ergab, dass das reife Protein über seinen N-Terminus (Aminosäuren 10-46) ein stabiles Homodimer bildet und die C-terminale PPIase-Domäne (Aminosäuren 100-213) durch eine lange  $\alpha$ -Helix (Aminosäuren 54-98) vom N-Terminus getrennt ist (Abb. 3A) [Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001]. Die Bildung von Homodimeren konnte auch auf der Bakterienoberfläche und in Lösung mit Hilfe von Cross-linking Experimenten bestätigt werden [Köhler *et al.*, 2003]. Seine Lokalisation auf der Oberfläche in Flüssigkultur und während der Infektion wurde mit Hilfe von Immunogoldstudien gezeigt (Abb. 3B) [Helbig *et al.*, 2001].



**Abb. 3: (A) Computerdarstellung von Mip als Homodimer.** Die 2,4 Å Kristallstruktur wurde für die Erstellung eines Ribbon-Modells verwendet. Die beiden Monomere dimerisieren über ihre N-Termini. Auf diese folgt jeweils eine lange  $\alpha$ -Helix, auf die C-terminal eine globuläre PPIase-Domäne folgt [Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001]. **(B) Immunogoldlokalisierung von Mip.** Goldgekoppelte Mip-spezifische Antikörper wurden für die Lokalisation von Mip benutzt. In der transmissionselektronen-mikroskopischen Aufnahme sieht man, dass die Partikel hauptsächlich auf der Oberfläche der Bakterien vorkommen [Helbig *et al.*, 2001]. **(C) Histologischer Vergleich von Lungengewebe infizierter Meerschweinchen.** Meerschweinchen wurden entweder mit einer *mip*-defizienten Mutante (rechts) oder mit dem isogenen Wildtyp *L. pneumophila* JR32 (links) infiziert. Nach 48 h sind in der Lunge der Wildtyp-Infektion starke Gewebeschäden festzustellen, wohingegen die Lunge mit Mip-negativen Legionellen intakte Lufträume aufweist [Wagner *et al.*, 2007].

Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass Mip eine PPIase (**p**eptidyl-**p**rolyl-**cis/trans**-isomerase) der FKBP-Klasse (siehe unten) ist [Fischer *et al.*, 1992]. PPIasen sind Proteine mit Chaperone-ähnlichen Funktionen, die ubiquitär vorkommen [Göthel und Marahiel, 1999, Galat, 2000]. Sie katalysieren die *cis-trans* Isomerisierung von Peptidbindungen vor Prolinen. Diese Bindungen sind wegen der zyklischen Natur der Prolinseitenkette und der daraus resultierenden mit 90 kJ/mol recht hohen Aktivierungsenergie der Isomerisierung häufig in der *cis*-Konformation. Daher ist die schnelle Faltung von Prolin-haltigen Proteinen unter physiologischen Bedingungen nur unter der Einwirkung von PPIasen möglich, deren erste Isolation 1984 gelang [Garel und Baldwin, 1973, Fischer *et al.*, 1984]. Derzeit sind an Hand von Sequenzhomologien drei unterschiedliche Klassen von PPIasen bekannt: die Cyclophiline, die F506 bindende Proteine (FKBP) und die Parvuline. Die Sequenzunterschiede liegen trotz derselben

katalytischen Funktion auch in den enzymatisch aktiven Domänen vor. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, dass jede Klasse ihre eigenen Inhibitoren hat. So ist Cyclosporin A (ein Undecapeptid aus Pilzen) ein spezifischer Inhibitor von Cyclophilinen. Auf der anderen Seite sind FK506 und Rapamycin (Makrolide aus Streptomyceten) typische Inhibitoren der FKBP, sowie Juglone ein Inhibitor der Parvuline [Göthel und Marahiel, 2000]. Mip ist ein bakterieller Vertreter der FKBP [Fischer *et al.*, 1992]. Daher kann die PPIase-Aktivität durch FK506 oder Rapamycin inhibiert werden.

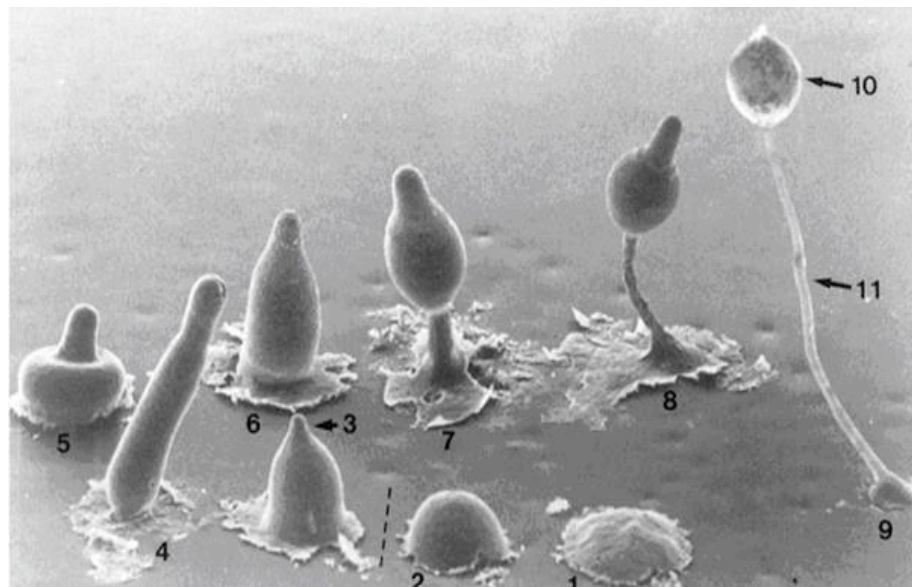
Die genaue Funktion von Mip während der Infektion ist noch nicht geklärt. Untersuchungen mit Mip-negativen Mutanten haben gezeigt, dass Mip nicht bei der Aufnahme in die Wirtszelle eine Rolle spielt, sondern dem Überleben der Bakterien in der frühen Phase der Infektion beiträgt [Cianciotto und Fields, 1992]. Um den Einfluss der PPIase-Aktivität zu überprüfen, wurden zwei konservierte Aminosäuren in der katalytischen Domäne ausgetauscht: Aspartat auf Position 142 wurde durch ein Leucin ersetzt (D142L) sowie Tyrosin auf Position 185 durch ein Alanin (Y185A). Zudem wurde der N-terminus deletiert, sodass eine Dimerisierung des Proteins nicht möglich war. Alle Mip-Mutanten wurden rekombinant hergestellt und wiesen *in vitro* eine PPIase-Aktivität von 2 % (T185A), 6 % (D142L) bzw. 100 % (N-terminal deletiert) auf [Wintermeyer *et al.*, 1995]. Infektionsstudien mit Mip-negativen *L. pneumophila*, die mit einem dieser Mutanten komplementiert wurden, zeigten in Infektionsstudien weder in *Acanthamoeba castellanii* noch in humanen Monozyten oder MΦ-ähnlichen U937-Zellen eine der Deletion vergleichbare Attenuation [Wintermeyer *et al.*, 1995]. Im Meerschweinchen konnten hingegen zwischen den Mutanten Unterschiede beobachtet werden. Das Fehlen des Mip-Proteins führte zu einer 60-fachen und somit verglichen mit Zell-Linien viel deutlicheren Abnahme der Bakterienzahl in den Lungen verglichen mit dem Wildtyp, wohingegen die Expression des verkürzten, monomeren Mips eine 10-fache Abnahme hervorrief. Die Expression der Y185A-Austauschmutante mit 2 % Restaktivität verursachte eine 5-fache Abnahme der aus der Lunge isolierten Bakterien [Köhler *et al.*, 2003]. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die Dimerisierung und die PPIase-Aktivität von Mip während der Infektion von Meerschweinchen von Bedeutung sind.

Die Tatsache, dass in fortgeschrittenen Stadien der Legionärskrankheit Bakterien sich im Körper verteilen und somit zu einem Multiorganversagen führen können sowie mikroskopische Befunde von Lungengewebe (Abb. 3C), legen nahe, dass die Legionellen in der Lage sind Epithelbarrieren zu zerstören. Diese Hypothese wurde in einem *in vitro* Zwei-Kammer-System überprüft, in dem die Lungenepithel-artige Zell-Linie NCI-H292 in einer oberen Kammer auf einer porösen Membran gezüchtet wird. Diese Zell-Linie, die auch eine extrazelluläre Matrix produziert, ist in der Lage, eine intakte Barriere aufzubauen. Bakterien, die auf so eine Epithelbarriere gegeben werden, können nur nach dem Überwinden dieser über die 3 µm großen Poren in die untere Kammer gelangen. In diesem etablierten System konnte eine Mip-bedingte 1000-fach bessere Transmigration von *L. pneumophila* beobachtet werden, die nicht durch Transzytose sondern extrazellulär ablief. Des Weiteren waren die Unterschiede zwischen den bereits erwähnten Mip-Mutanten und dem Wildtyp in diesem System nicht so ausgeprägt wie im Meerschweinchen-Modell, wobei unter den Mutanten erneut den größten Unterschied zum Wildtyp die Y185A-Mutante aufwies [Wagner *et al.*, 2007]. Da das Lungenepithel neben einer geschlossenen Schicht von Pneumozyten größtenteils auch aus einer proteinösen extrazellulären Matrix (ECM) besteht, wurde die Bindungsfähigkeit von Mip an die ECM bzw. an einzelne Komponenten dieser getestet. Hier zeigte sich, dass Mip an die ECM binden kann und innerhalb der ECM gegenüber Kollagen IV die höchste Affinität besaß, wohingegen an nicht-kollagenöse Proteine wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin oder Albumin keine nennenswerte Bindung erfolgte [Wagner *et al.*, 2007]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von Mip an Kollagen IV genauer untersucht.





Natürlicher Weise kommen Dictyostelien im Waldboden und verrottendem organischem Material vor, in dem sie Bakterien und einzellige Pilze phagozytieren [Raper, 1935]. Wenn jedoch Nährstoffquellen versiegen, können einzelne Zellen durch die Produktion und Aussonderung von cAMP als Botenstoff die Bildung eines aus bis zu 100.000 Zellen bestehenden Aggregats verursachen, das phototaktisch an einen exponierten Ort wandern kann. Sobald ein geeigneter Ort erreicht wird, setzt ein Differenzierungsvorgang ein, infolge dessen sich das Zellaggregat auf einem zellulären Sockel aufrichtet. Ein weiterer Teil der restlichen Zellen bildet einen Stiel und einen Sporenkopf, das so genannte Sorokarp. Dieses beinhaltet die restlichen Zellen, die sich zu Sporen differenzieren. Sporen sind sehr resistent gegen diverse Umwelteinflüsse, und werden durch physikalische Faktoren verteilt. Bei günstigen Umweltbedingungen können die Sporen zu solitären amöboiden Zellen keimen, und der Zyklus kann fortgesetzt werden (Abb. 5).



**Abb. 5: Darstellung verschiedener Strukturen während der Entwicklung von *D. discoideum*.** Unabhängig voneinander lebende Amöben aggregieren zu einem vielzelligen Organismus. Während der Aggregation (1 und 2) differenzieren sich die Zellen in Prästiel- und Präsporenzellen unabhängig von ihrer Position. Die Prästielzellen wandern nach oben und bilden die spätere Spitze der Anordnung (3). Die spitzenförmige Anordnung verlängert sich (4) und sammelt sich an (5-9). Während der letzten Phase des Wachstums (7-8) differenzieren sich Präsporen- und Prästielzellen in entsprechende Sporen- und Stielzellen. Der entstandene Fruchtkörper (9) ist ungefähr 4-10 mm hoch und besteht aus einem Sporenköpfchen (10) auf einem dünnen Stiel (11).

## 2.2 Genetik von *D. discoideum*

Mycetozoa haben sich im Laufe der Evolution früher von der Linie getrennt (Abb.1), die letztendlich zu den Pilzen und den höheren Tieren geführt hat. Dennoch sind sie wegen der stärkeren Divergenz der Pilze in den Grundzügen ihrer Zellbiologie wie z.B. Motilität oder Lipidsignalwege den Metazoa viel ähnlicher geblieben [Insall, 2005]. Die Sequenzierung und Annotation des gesamten Genoms ist bereits erfolgt und bestätigen die Verwandtschaft zu den höheren Tieren auf der Ebene des Genoms.

Das Genom von *Dictyostelium discoideum* ist A/T-reich (77 %), haploid, 34 Mb in Größe und kodiert auf sechs Chromosome verteilt für ca. 12.500 Proteine. Unter diesen sind Mitglieder der Familien 2, 3 und 5 der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR), die bis dato nur von Tieren bekannt waren. Viele Proteine von Adhärenzverbindungen, die für die Ausbildung von epithelartigem Gewebe verantwortlich und somit typisch für Metazoa sind, konnten in *D. discoideum* identifiziert werden nicht aber in den Pilzen. Außerdem besitzt *Dictyostelium* 67 Gene, deren humane Orthologe mit Krankheiten in Verbindung stehen [Eichinger *et al.*, 2005].

Neben dieser konservierten Verwandtschaft und eines sequenzierten, kompakten Genoms haben (i) die Kultivierung von axenisch (also Bakterien-frei) wachsenden Mutanten [Watts und Ashworth, 1970]; (ii) die Erstellung eines Transformationssystems zur gezielten Herstellung von Mutanten [Nellen *et al.*, 1984, Howard *et al.*, 1988], sowie (iii) die Einführung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als ein Werkzeug zur Beobachtung von Proteinexpression und -lokalisation in lebenden Zellen [Chalfie *et al.*, 1994] die Etablierung von *D. discoideum* als ein Modellorganismus der Zellbiologie ermöglicht. Mit der Zeit hat sich auch das Spektrum der molekularbiologischen Methoden erweitert (Tab. 2).

Tab. 2: Zusammenfassung der wichtigsten molekularbiologischen Werkzeuge, die im Modellsystem *D. discoideum* eingesetzt werden.

Methode	Charakteristika
Zufällige (Konventionelle) Mutagenese	<ul style="list-style-type: none"> <li>- willkürliche Mutationen</li> <li>- Selektion anhand von Phänotyp</li> </ul>
Homologe Rekombination [DeLozane und Spudich, 1987]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gezielte Mutation von Genen</li> <li>- Selektion mit Hilfe von Antibiotikaresistenz- oder Biosynthesegenen</li> </ul>
REMI (restriction enzyme mediated integration) [Kuspa und Loomis, 1992]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wahl des Restriktionsenzym bestimmt Ort und Häufigkeit der Integration.</li> <li>- Selektion mit Hilfe von Antibiotikaresistenz- oder Biosynthesegenen</li> </ul>
Homologe Rekombination und Cre- <i>loxP</i> [Faix <i>et al.</i> , 2004]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gezielte Mutation von Genen</li> <li>- Selektion mit Hilfe von Antibiotikaresistenz- oder Biosynthesegenen</li> </ul>
GFP-Fusionsproteine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mehrfache Verwendung desselben Selektionsgens für die Mutation unterschiedlicher Gene</li> <li>- Untersuchungen zur Lokalisation bzw. Expression eines Proteins in lebenden Zellen.</li> </ul>
RNA-Interferenz [Martens <i>et al.</i> , 2002]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Untersuchung von essentiellen Proteinen, bei denen eine Zerstörung des kodierenden Gens nicht möglich ist.</li> </ul>
<i>tet</i> -ON/OFF-Systeme [Blaauw <i>et al.</i> , 2000]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gesteuerte Expression eines Gens.</li> <li>- die temporäre Ausschaltung eines Gens, insbesondere wenn keine klassische Selektion möglich ist.</li> </ul>

### 2.3 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus der Zellbiologie

Die oben genannten Vorteile zusammen mit der einfachen Kultivierbarkeit von großen, homogenen Kulturen für biochemische und genetische Studien haben dazu geführt, dass *D. discoideum* zu einem wichtigen Modellorganismus der

Zellbiologie geworden ist. Mit Hilfe von *Dictyostelium* konnten viele grundlegende Fragen der Zellbiologie darunter des Cytoskeletts und dessen Dynamik beantwortet werden. So wurde z.B. Coronin, ein Actin-bindendes Protein, das sich an Phagozytosebechern der Plasmamembran anreichert und während der Phagozytose eine wichtige Rolle spielt, zuerst in *Dictyostelium* beschrieben [de Hostos *et al.*, 1991 und 1993]. Insbesondere Studien zur Phagozytose und zum endosomalen Verkehr haben dazu geführt, dass die zeitliche Reifung des Phagosoms in *Dictyostelium* zum Teil viel besser beschrieben ist als in anderen Systemen [Cosson und Soldati, 2008].

*D. discoideum* kann Partikel mittels Phagozytose oder Makropinozytose aufnehmen [Duhon und Cardelli, 2002]. Dabei geht man davon aus, dass Phagozytose generell ein Rezeptor-vermittelter Prozess zur gezielten Aufnahme von Partikeln ist, die größer als 1 µm im Durchmesser sind. Die Plasmamembran breitet sich in Form von Filopodien um das aufzunehmende Objekt und umschließt es. Makropinozytose dient dagegen in erster Linie der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Botenstoffen oder kleineren gelösten Substanzen. Die Bewegungen auf der Plasmamembran sind transients, sodass man auch von der Bildung von „Ruffle“-Strukturen redet. Dennoch können auch aus diesen Ruffels gelegentlich Membranabschnürungen in das Zytoplasma entstehen. Die so gebildeten Makropinosomen können einen Durchmesser von 0,2 bis 10 µm haben [Swanson, 2008, Bozzaro *et al.*, 2008]. Die Aufnahme einiger Pathogene wie *Salmonella typhimurium*, *L. pneumophila* oder des Vacciniavirus weist in ihrem Ablauf große Ähnlichkeiten zur Makropinozytose auf [Alpuche-Aranda *et al.*, 1994, Watarai *et al.*, 2001, Mercer und Helenius, 2008].

Phagozytose und Makropinozytose nehmen bis zu einem gewissen Grade ähnliche zelluläre Vorgänge in Anspruch, werden aber dennoch unterschiedlich reguliert. Beide Prozesse benötigen das Actinzytoskelett, Actin-bindende Proteine, Myosine und kleine GTPasen wie Rab7 oder RasS für die Verformung und Abschnürung der Plasmamembran. Jedoch werden sie von unterschiedlichen Secondmessengern gesteuert (Abb. 6). Während Bildung von Diacylglycerol (DAG) durch die Phospholipase C (PLC) die Phagozytose fördert, ist für die Entstehung des Makropinosoms Phosphatidylinositol(3,4,5)-tris-phosphat

(PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) und somit die Aktivität der PI-3-Kinase notwendig [Rupper und Cardelli, 2001, Duhon und Cardelli, 2002].

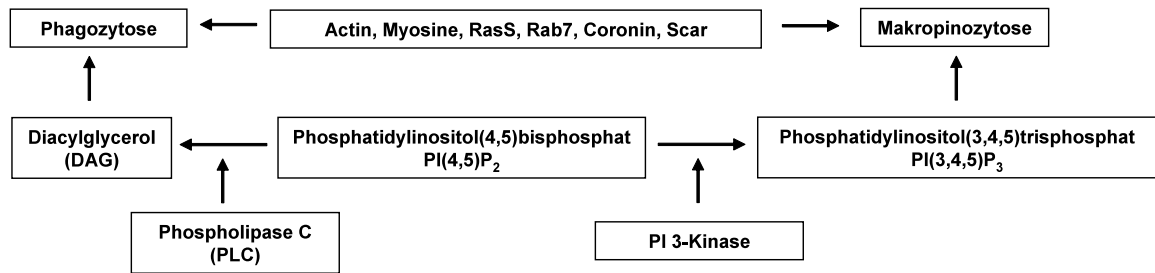
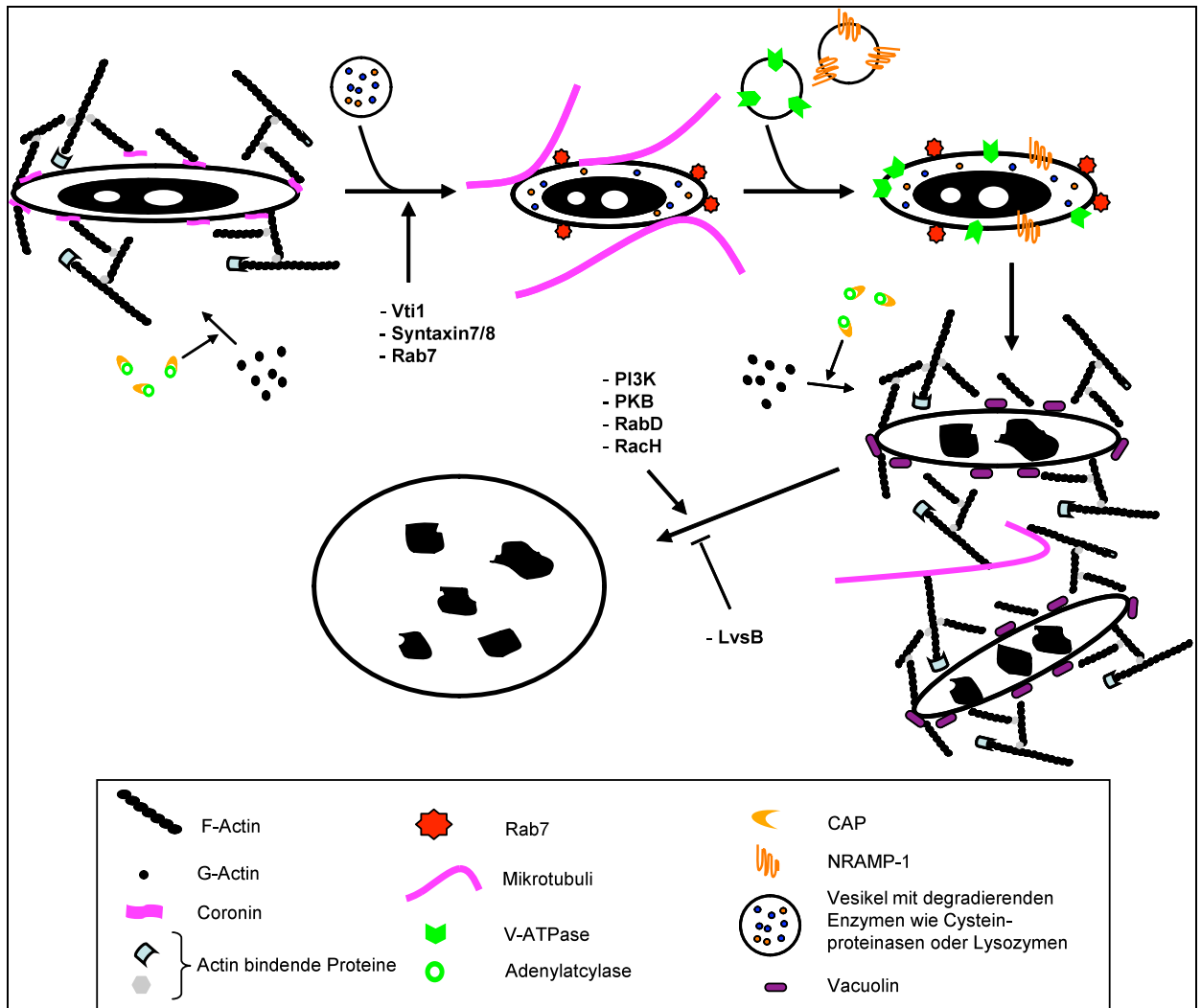


Abb. 6: Schematische Darstellung der grundlegenden Faktoren, die bei der Initiierung der Phagozytose und der Makropinozytose eine Rolle spielen.

Nach ihrer Entstehung durchlaufen Phagosomen und Makropinosomen ähnliche Stadien, die letztendlich zu der Prozessierung des aufgenommenen Fremdkörpers und zur anschließenden Metabolisierung dessen führen. Die einzelnen Faktoren, die diese sogenannte Phagosomenreifung beeinflussen, sind nicht im Detail aufgeklärt. Dennoch sind viele Schlüsselfaktoren bekannt, die den Ablauf beeinflussen oder steuern (Abb. 7). Das Actinzytoskelett und die Actin-bindenden Proteine Coronin 1 und Comitín haben eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Abschnürung des Phagosoms. Kurz danach dissoziieren sie jedoch von der Phagosommembran und werden durch Mikrotubuli ersetzt, die die Vesikel weiter ins Zellinnere befördern [Rauchenberger *et al.*, 1997, Rupper *et al.*, 2001, Clarke *et al.*, 2002, Schreiner *et al.*, 2002]. Die Dissoziation von Actin und Actin-bindenden Proteinen ermöglicht die Verschmelzung mit weiteren Vesikeln des Endolysosomalen Systems, die unter anderem hydrolytische Enzyme wie Cysteinproteinasen oder Lysozyme beherbergen. Zudem wird eine Assoziation mit der kleinen GTPase Rab7 beobachtet, die fast über den gesamten Zeitraum besteht [Rupper und Cardelli, 2001]. Als nächster wichtiger Schritt erfolgt die Ansäuerung des Phagosoms durch die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase. Diese und weitere Transporter wie NRAMP 1 (**n**atural **r**esistance **a**ssociated **m**acrophage **p**rotein), das divalente Kationen wie Fe<sup>2+</sup> transportiert, liegen in einem prälysosomalen Reservoir von Vesikeln vor, die mit Hilfe von SNARE-Proteinen wie Vti1 oder den Syntaxinen mit dem Phagosom

verschmelzen [Padh *et al.*, 1989, Souza *et al.*, 1997, Clarke *et al.*, 2002, Neuhaus *et al.*, 2002, Peracino *et al.*, 2006].



**Abb. 7: Schematischer Ablauf der Phagosomenreifung mit den Schlüsseldeterminanten.** Die Aufnahme von Partikeln benötigt die Verformung der Plasmamembran durch das Actinzytoskelett und Actin-bindende Proteine. Diese dissoziieren kurz nach der Aufnahme von Phagosom und ermöglichen somit die Anlagerung anderer Proteine wie Vti1 und Syntaxinen, Proteine der SNARE-Komplexe, oder der kleinen GTPase Rab. Diese vermitteln die Verschmelzung des Phagosoms mit prälysosomalen Vesikeln, die hydrolytische Enzyme oder Transporter, wie die  $H^+$ -ATPase oder NRAMP-1, beinhalten. Die Ansäuerung des Phagosoms auf pH 5 und die hydrolytischen Aktivitäten zerstören das aufgenommene Partikel. Vesikel mit abgebautem Material verschmelzen unter dem Einfluss von kleinen GTPasen, des Cyclase-assoziierten Proteins (CAP) und dem Actin und Actin-bindenden Proteinen wie Vacuolin.

Durch die konzertierte Aktion der hydrolytischen Enzyme sowie der Ansäuerung und Veränderung der Ionenhomöostase werden aufgenommene organische Partikel innerhalb kürzester Zeit zerstört. Anschließend wird häufig eine

homotypische Fusion der Vesikel beobachtet, die zerstörtes Material beinhalten. An diesem Vorgang sind wiederum das Actinzytoskelett, das Cyclase-assoziierte Protein (CAP), kleine GTPasen, wie RabD oder RacH, Proteinkinasen wie PKB oder Enzyme des Phosphoinositol-Stoffwechsels wie die PI 3-Kinase beteiligt [Duhon und Cardelli, 2002, Harris *et al.*, 2002, Sultana *et al.*, 2005, Somesh *et al.*, 2006, Bozzaro *et al.*, 2008]. Es konnte aber auch wie im Falle von LvsB gezeigt werden, dass Faktoren vorhanden sind, die die homotypische Fusion unterbinden [Harris *et al.*, 2002, Charette und Cosson, 2007]. Unverdautes Material wird anschließend durch Exozytose freigelassen (Abb. 7).

Wie es Untersuchungen zum Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrom (SBDS) oder Lissencephalie zeigen, ist *D. discoideum* auch für medizinisch relevante Fragen ein geeignetes Modellsystem [Williams *et al.*, 2006]. SBDS ist eine autosomal rezessive Krankheit, die zu 70 % mit dem SBDS-Gen assoziiert ist. Die Patienten leiden unter einem Mangel an neutrophilen Granulozyten (Neutropenie). Die Polymorph-Nukleären Leukozyten (PMN) dieser Patienten zeigen zudem chemotaktische Fehlverhalten [Agget *et al.*, 1980]. Gesunde PMNs richten sich in einem räumlichen Gradienten von n-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) ähnlich aus wie *D. discoideum* in einem cAMP-Gradienten und wandern auf die Quelle des Botenstoffs hin [Parent, 2004]. Die Parallelen in den chemotaktischen Fähigkeiten beider Systeme hat zur Verwendung von *Dictyostelium* als ein einfach manipulierbares Modell für die Fortbewegung von Leukozyten geführt [Devreotes und Zigmond, 1988, Noegel und Schleicher, 2000, Jin *et al.*, 2008]. *Dictyostelium* besitzt ein SBDS-homologes Gen, das für ein Protein mit 38 % Identität und 69 % Ähnlichkeit kodiert. In einer *Dictyostelium*-Mutante, die ein an GFP fusioniertes SBDS Protein exprimiert, konnte gezeigt werden, dass sich dieses Protein während der Chemotaxis für bis zu einer Minute in Pseudopodien anreichert. Vom *Dictyostelium*-SBDS-Protein ist zudem bekannt, dass es RNA-bindende Motife besitzt [Wessels *et al.*, 2006]. Somit wird vermutet, dass durch das SBDS-Protein für die Chemotaxis wichtige mRNAs in Pseudopodien angereichert und vor Ort translatiert werden.

Lissencephalie ist eine seltene, genetisch bedingte Krankheit, die wie im Falle vom LIS1-Gen häufig auf Mutationen in Zytoskelettproteinen zurückzuführen ist. LIS1 ist ein Motorprotein, das Dynein-abhängige Bewegungen entlang der



Mikrotubuli vermittelt. *Dictyostelium* besitzt auch ein LIS1-Gen, dessen Proteinprodukt 60 % identisch mit seinem humanen Homologen ist. Eine häufig auftretende und Krankheits-assoziierte Punktmutation wurde in das *Dictyostelium* LIS1-Gen eingeführt, und führte zu Störungen in der Struktur des Golgi-Apparates, in der Nukleus-Centrosom-Assoziation sowie im Gleichgewicht zwischen G- und F-Actin [Rehberg *et al.*, 2005]. Zudem besitzt *Dictyostelium* als einziges invertebrates Modellsystem Doublecortin, ein weiteres häufig mit Lissencephalie zusammenhängendes Protein [Gleeson, 2000, Williams *et al.*, 2006].

## 2.4 *Dictyostelium discoideum* als Wirtssystemorganismus

Die Idee *D. discoideum* als ein Testsystem für bakterielle Krankheitserreger zu verwenden ist fast genauso alt wie seine Entdeckung. So wurde bereits kurz nach der ersten Beschreibung *D. discoideum* auf human- und pflanzenpathogenen Bakterien kultiviert, um zu beobachten, ob diese auch einen negativen Einfluss auf Wachstum oder Entwicklung der Amöben haben können [Raper, 1939]. Die Verwendung von *Dictyostelium* als ein Wirtssystem wurde jedoch erst mit der Entstehung der zellulären Mikrobiologie [Cossart *et al.*, 1996] und dem damit verbundenen Bedarf an einfach zugänglichen Modellsystemen höchst interessant und explizit umgesetzt. Hierbei waren die Ähnlichkeit zu humanen MΦ auf zellulärer Ebene, einfache Kultivierung und genetische Zugänglichkeit entscheidende Argumente.

Erste Arbeiten mit *L. pneumophila* zeigten, dass sich dieser Umweltpathogen auch in amöboiden Dictyostelien effizient vermehren kann [Hägele *et al.*, 2000 und Solomon *et al.*, 2000]. Diese Arbeiten führten dazu, dass *D. discoideum* zur Untersuchung von Virulenzmechanismen von weiteren extra- und intrazellulären Pathogenen verwendet wurde. Inzwischen ist die Zahl der verwendeten Pathogenen deutlich gestiegen und beinhaltet wichtige humanpathogene wie *P. aeruginosa* [Pukatzki *et al.*, 2002, Alibaud *et al.*, 2008], *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium avium* [Skriwan *et al.*, 2002], *Klebsiella aerogenes* [Benghezal *et al.*, 2006] und *Mycobacterium marinum* [Solomon *et al.*, 2003]. Es wurde auch zum ersten Mal das Virulenzpotential

eines Typ VI sekretierten Proteins von *Vibrio cholerae* mit Hilfe von *D. discoideum* beschrieben [Pukatzki *et al.*, 2006]. Mit Hilfe von GFP-Mutanten wurde der lichtmikroskopische Nachweis erbracht, dass *M. marinum* aus seinem Phagosom ausbrechen kann und ins Zytosol des Wirtes gelangt [Hagedorn und Soldati, 2007].

Bereits etablierte Methoden bieten vielseitige Möglichkeiten, die Wirt-Pathogen-Wechselwirkung von der Seite des Wirtes aus zu untersuchen. Studien mit Deletionsmutanten haben zur Identifikation von Wirtsfaktoren geführt, die die Vermehrung von *L. pneumophila* beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass das Actin-bindende Protein Coronin zwar in der Aufnahme eine Rolle spielt, aber nicht in der Vermehrung [Solomon *et al.*, 2000]. Ähnlich konnte gezeigt werden, dass sich *L. pneumophila* in Profilin-defizienten *Dictyostelium* Zellen sich besser vermehren kann als im Wildtyp [Hägele *et al.*, 2000]. Die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signalkaskaden an der Infektion konnte mit Hilfe von Calnexin- oder Calreticulin-defizienten Zellen gezeigt werden. Das Fehlen eines dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden ER-Proteine führte sowohl zu einer deutlich schlechteren Aufnahme als auch zu einer geringeren Vermehrung der Bakterien [Fajardo *et al.*, 2004]. Dass die Transformation des *Legionella*-haltigen Phagosoms in eine replikationsfreundliche Nische nicht nur bakterielle Effektoren sondern auch Wirtsfaktoren benötigt, konnte sehr gut an Hand des RtoA-Proteins (**RatioA**) gezeigt werden [Li *et al.*, 2005]. Dieses Serin-reiche Protein spielt in *Dictyostelium* bei Fusionsvorgängen von Phospholipid-haltigen Vesikeln eine Rolle und beeinflusst deren pH [Brazill *et al.*, 2001]. Im Einklang damit sind RtoA-defiziente Zellen gegen eine Infektion mit *L. pneumophila* deutlich resistenter als der Wildtyp.

Unter Verwendung von GFP-Fusionsproteinen konnte die Dynamik des *Legionella*-haltigen Phagosoms während der Infektion mit Hilfe von Lebendaufnahmen näher charakterisiert werden. Hierdurch wurde nachgewiesen, dass (i) Coronin nur während der Aufnahme der Legionellen mit dem Phagosom assoziiert ist, (ii) das Phagosom im weiteren Verlauf mit den ER-Proteinen Calnexin und Calreticulin assoziiert sowie (iii) zu frühen Zeitpunkten die vakuoläre ATPase-Untereinheit nicht mit dem Phagosom

assoziiert und keine Ansäuerung stattfindet, aber dies zu den späten Zeitpunkten durchaus der Fall ist [Lu und Clarke, 2005]. Die Beteiligung des Cytoskeletts, des ERs und der Ablauf der Phagosomenreifung sind wichtige Kennzeichen für den Ablauf der *Legionella*-Infektion in humanen Makrophagen. Diese Beobachtungen unterstützen somit, dass in *Dictyostelium* nicht nur dieselben Wirtsfaktoren an der Infektion beteiligt sind wie in Makrophagen, sondern dass auch der Fortgang der Infektion in den beiden Systemen vergleichbar ist und sie sprechen für die Qualitäten von *D. discoideum* als Modellorganismus.

Seit einigen Jahren steht auch ein DNA-Microarray von *D. discoideum* zur Verfügung, das mit Hilfe einer EST-(expressed sequence tag) Bank von *Dictyostelium* hergesellt wurde. Auf diesem Microarray sind Oligonukleotidproben von ca. 6.000 Genen, somit etwa die Hälfte des Genoms, vorhanden. Es wurden vergleichende Transkriptomanalysen von *D. discoideum* durchgeführt, die mit virulenten oder avirulenten *Legionella*-Stämmen infiziert wurden. Diese Studien zeigten, dass die größten Unterschiede in der Anzahl der differenziert regulierten Gene 24 h nach der Infektion zu beobachten sind [Farbrother *et al.*, 2006]. Die bioinformatische Auswertung der Daten ergab, dass die regulierten Gene anhand ihrer biologischen oder biochemischen Funktion unterschiedlichen Kategorien zugewiesen werden können. So wurden Gene für hydrolytische Aktivitäten, wie Lysozym oder Peptidoglycankatabolismus, und Gene für diverse metabolische Enzyme, die dem Wirt zum Aufbau von Makromolekülen dienen, reprimiert. Unter den exprimierten Genen, waren viele die im tRNA-, Aminosäure- bzw. Nukleotidmetabolismus eine Rolle spielen. Diese Ergebnisse bestätigten zum einen, dass *L. pneumophila* in der Lage ist in *Dictyostelium* Vorgänge zu Unterbinden, die zu dessen Zerstörung führen würden. Zum anderen legten sie die Schlussfolgerung nahe, dass eine Anreicherung von Grundbausteinen wie Aminosäuren, tRNAs oder Nukleotiden erfolgen muss, die der Wirt nicht selbst verwerten kann, da Gene der Transkription und Translation reprimiert sind. Diese angereicherten kleinen Bausteine können somit die wichtigen Aminosäure- und Kohlenstoffquellen für das intrazelluläre Wachstum der Legionellen darstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *D. discoideum* wegen seiner zellbiologischen Ähnlichkeit zu humanen Leukozyten und der großen Bandbreite anwendbarer biochemischer und molekularbiologischer Methoden ein wichtiger Modellorganismus der zellulären Mikrobiologie ist.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Das Mip-Protein von *L. pneumophila* bindet an das humane Collagen IV in der extrazellulären Matrix und ist für die Transmigration der Bakterien über eine intakte Epithelbarriere verantwortlich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die molekulare Interaktion zwischen Mip und Collagen IV untersucht werden. Dafür sollte eine mögliche Collagenbindungssequenz von Mip mit Hilfe von Peptidarrays identifiziert werden. Die Interaktion zwischen Mip und der identifizierten Bindungssequenz sollte mit Hilfe von Kopräzipitationsexperimenten, Bindungsassays, PPIase-Messungen und *in vitro* Transmigrationsexperimenten verifiziert werden. Die auf diese Weise gewonnenen Informationen über die Interaktion beider Proteine ermöglichen die Entwicklung alternativer Therapieansätze, die die extrazelluläre Virulenz von *L. pneumophila* verringern.

Desweiteren sollte der Modellcharakter der einzelligen Amöbe *D. discoideum* für die zelluläre Mikrobiologie ausgenutzt werden. Mit Hilfe von definierten Deletionsmutanten sollten mögliche Wirtsfaktoren identifiziert werden, die eine Rolle während der intrazellulären *Legionella*-Infektion spielen. Außerdem sollten die Einflüsse der abiotischen Faktoren pH und Eisen während der *Legionella*-Infektion untersucht werden. Dafür sollte durch die Zugabe von  $\text{NH}_4^+$  oder Eisenchelatoren der lysosomale pH-Wert bzw. der Eisenvorrat manipuliert werden.

In Kooperation mit Dr. Eichinger von der Universität zu Köln sollten Transkriptomanalysen von Dictyostelien durchgeführt werden, die mit *Mycobacterium marinum* infiziert wurden. Zum einen sollten die transkriptionellen Änderungen in infizierten Dictyostelien über einen Zeitraum von 72 h beobachtet werden. Zum anderen sollten Vergleiche zwischen Dictyostelien gezogen werden, die mit einem virulenten *M. marinum*-Stamm oder dessen avirulenten  $\Delta\text{pmiA}$ -Mutante infiziert wurden. Mit Hilfe dieser Ansätze sollten Gene identifiziert werden, die für die Infektion mit virulenten Mykobakterien spezifisch sind. Diese Studien sollten auch den Vergleich der Infektionsprozesse unterschiedlicher Pathogene ermöglichen.

### III MATERIAL und METHODEN

#### 1 Chemikalien und Geräte

##### 1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in folgender Tabelle aufgelistet.

**Tab. 3: Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.**

Gerät	Typ/Hersteller
12-Kanal-Pipetten, 20 µl und 200 µl	Pipet-Lite LTS L12-20 und L12-200 L12-200, Rainin
Analysenwaage	JL-180, Chyo
Blotter (semi dry)	Perfect Blue Electroblotter Modell SEDEC M, Peqlab GmbH
Brutschrank (30 °C bzw. 37°C)	Typ 5060 EC- CO2 Platteninkubator, Heraeus
Chemilumineszenz Imager	INTAS, Chemocam HR 16
ELISA-Reader (Mikrotiterplatten)	Multiskan Ascent, Thermo
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab, Zeiss
Fluoreszenzmikroskop (invers)	Axiovert25, Zeiss
Fluoreszenzreader (Mikrotiterplatten)	Fluoroskan Ascent, Thermo
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa
Gefrierschrank -20°C	Senator, Privileg
Gefrierschrank -80°C	Revco
Grobwaage	470 bzw. 572, Kern
Heizblock	Liebisch
Hybridisierungssofen	Mini-10, Hybaid
Klimaschrank (24 bzw. 25,5 °C)	ICP 400, Memmert
konfokales Lasermikroskop	LSM 510, Zeiss

Gerät	Typ/Hersteller
Kühlschrank	Super Öko, Privileg
Kühlzentrifuge	Multifuge 1 L-R und Megafuge 1.0R, Biofuge 13R, Heraeus
Magnetrührer	Typ RMO, Gerhardt
Mikroskop für Zellkultur (invers)	Zeiss
Mikrowelle	Micromat, AEG
Netzgeräte	E455, Consort EPS 200, Amersham Biosciences PowerPac 3000, Bio-Rad
Pipetten	Eppendorf (10–100 µl) Rainin (2–20 µl, 100–1000 µl) Pipet-Lite LTS L-10, Rainin (0,5–10 µl)
pH-Meter	MultiLine P4, WTW
Schüttler, groß	HS501 digital, IKA
Schüttler, klein	KS125 basic, IKA
Schüttler für <i>Dictyostelium</i> -Kultur (im 21,5 °C Raum)	Edmund Bühler, KS-15
Schüttelinkubator (37 °C)	Certomat BS-1, B. Braun
Schüttelinkubator (30 °C)	Edmund Bühler, SM-30
Proteingelkammer (für 8x6 cm-Gele)	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad
Quecksilberdampflampe (für die Fluoreszenzmikroskopie)	HB050/AC
Sicherheitswerkbank	Microflow Biological Safety Cabinet, Nunc
Spektrophotometer (UV/Vis) für OD-Messungen	Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences
Spektrophotometer (UV/Vis) für Bestimmung von Protein- und Nukleinsäurekonzentrationen	NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH
Vakuumpumpe	Laboport, KNF Neuberger

Gerät	Typ/Hersteller
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C, Eppendorf
Transmissionselektronenmikroskop	A100 TEM, Zeiss
Vortexer	Mixomat, Boskamp
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Carl Roth GmbH
Zentrifuge (für $g \geq 5000$ )	J2-HC mit JA-10-, JA-14, JA-20-Rotor, Beckman
Zentrifuge (für $g \leq 5000$ )	Megafuge 1L-R, Heraeus
Zentrifuge (Zellkultur)	Heraeus

## 1.2 Chemikalien

Für diese Arbeit wurden die gängigen Chemikalien der Molekularbiologie und Proteinbiochemie von den Firmen AppliChem, Darmstadt; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen und Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg bezogen.

## 1.3 Antibiotika/Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in der Tabelle 4 aufgelistet. Die Stocklösungen in  $H_2O_{dd}$  wurden mit Hilfe von  $0,22 \mu m$  Sterilfilter (Millipore) steril filtriert. Die Zugabe in Agar-Medien erfolgte erst, nachdem diese auf eine Temperatur von ca.  $50^\circ C$  abgekühlt waren.

**Tab. 4: Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika.**

Antibiotikum	Hersteller	Stocklösung	Aufbewahrung
Ampicillin	Carl Roth GmbH	100 mg/ml in $H_2O_{dd}$	$-20^\circ C$
Blasticidin	SigmaAldrich	10 mg/ml in $H_2O_{dd}$	$4^\circ C$ (bis zu 1 Jahr)
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH	50 mg/ml in 96 % Ethanol	$-20^\circ C$
G418	PAA	5-50 mg/ml in $H_2O_{dd}$	$4^\circ C$ (bis zu 1 Jahr)



Antibiotikum	Hersteller	Stocklösung	Aufbewahrung
Gentamicin	SigmaAldrich	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	-20 °C
Hygromycin	SigmaAldrich	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	4 °C (bis zu 1 Jahr)
Kanamycin·HCl	Carl Roth GmbH	25–50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	-20 °C
Streptomycin·HCl	Carl Roth GmbH	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	-20 °C
FK506	LC Laboratories	10 mg/ml in DMSO	- 20 °C
Rapamycin	LC Laboratories	10 mM in DMSO	-20 °C

## 1.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

**Tab. 5: Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.**

Antikörper	Hergestellt in/ gegen	Verwendung/ Verdünnung	Referenz oder Hersteller/Kat. Nr.
2D8 (monoklonal)	Maus/Mip	WB*/ 1:1.000	Wintermeyer <i>et al.</i> , 1995
<i>L.p.</i> (266) (monoklonal)	Maus/ <i>L. pneumophila</i> - Gesamtzellen	IFA**/1:500	Santa Cruz Biotechnology/ sc-57898
paMip (polyklonal)	Maus/Mip	WB*/1:1.000	Wintermeyer <i>et al.</i> , 1995
αMouse IgG(H+ L) FITC-gekoppelt	Ziege/Maus IgG	IFA**/1:100	ZYMED/62-6312
αMouse IgG(H+ L) Alexa Fluor 568- gekoppelt	Ziege/Maus IgG	IFA**/1:100	Invitrogen/A11031
αMouse IgG HRP-geoppelt	Ziege/Maus IgG	WB*/1:25.000	Dianova/ 115-035-062
αRabbit IgG(H+ L) FITC-gekoppelt	Ziege/Hasen IgG	IFA**/1:100	ZYMED/81-6111

\*WB=Western Blot, \*\*IFA= Immunfluoreszenzanalyse

## 1.5 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

**Tab. 6: Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.**

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>Legionella pneumophila</i> Corby	Wildtyp, Patientenisolat	Jepras <i>et al.</i> , 1985
<i>Legionella pneumophila</i> Phil.1 JR32 ( <i>L. p.</i> JR32)	Wildtyp, restriktionsdefizient, Sm <sup>R</sup>	Marra und Shuman, 1989
<i>Legionella pneumophila</i> Phil.1 JR32-2	$\Delta mip$ , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Wintermeyer <i>et al.</i> , 1995
<i>Mycobacterium marinum</i> Aronson 1926	Wildtyp, Patientenisolat	DSMZ, Braunschweig DSM No. 44750
<i>Mycobacterium marinum</i> R93	Wildtyp zu <i>M. m.</i> P1	Robinson <i>et al.</i> , 2007
<i>Mycobacterium marinum</i> P1	$\Delta pmiA$ , Km <sup>R</sup>	Robinson <i>et al.</i> , 2007

Sm<sup>R</sup> (Streptomycinresistenz), Km<sup>R</sup> (Kanamycinresistenz)

## 1.6 Zell-Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linien sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

**Tab. 7: Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linien.**

Zell-Linie	Charakteristika	Referenz
<i>Acanthamoeba castellanii</i> C3	Wildtyp	ATCC 50739 <sup>TM</sup>
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2	Wildtyp, axenisch	Prof. Schleicher, LMU München
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( $\Delta atg9$ )	Autophagie related protein 9- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> AX2, Bs <sup>R</sup>	Dr. Eichinger, Universität zu Köln

Zell-Linie	Charakteristika	Referenz
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( <i>cap::bsr</i> )	<i>D. d.</i> AX2 mit 5 % Expression des CAP- Proteins, Bs <sup>R</sup>	Sultana <i>et al.</i> , 2005 Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( $\Delta$ <i>crnA</i> )	Coronin 1- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> AX2, Bs <sup>R</sup>	Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( $\Delta$ <i>crnB</i> )	Coronin 7- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> AX2, Bs <sup>R</sup>	Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 DKO8	Coronin 1 und 7- Doppeldelltionsmutante von <i>D. d.</i> AX2, Bs <sup>R</sup> , G418 <sup>R</sup>	Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( <i>crnB::gfp</i> )	<i>Dictyostelium</i> <i>discoideum</i> AX2 ( $\Delta$ <i>crnB</i> ) komplementiert mit einer Coronin 7-GFP- Fusion, G418 <sup>R</sup>	Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( $\Delta$ <i>pipkinA</i> )	Phosphaatidylinositol- 4-phosphat-Kinase- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> AX2, Bs <sup>R</sup>	Guo <i>et al.</i> , 2001 Dictybase/DBS0236779
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( $\Delta$ <i>pldB</i> )	Phospholipase D- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> AX2, Bs <sup>R</sup>	Chen <i>et al.</i> , 2005 Dictybase/DBS0236796
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ( $\Delta$ <i>racH</i> )	Rac H- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> AX2, Bs <sup>R</sup>	Dr. Rivero, University of Hull, UK
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4	Wildtyp, axenisch	Prof. Loomis, UC San Diego, USA
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 ( $\Delta$ DG1112)	DG1112- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> AX4, Bs <sup>R</sup>	Prof. Loomis, UC San Diego, USA

<i>Dictyostelium discoideum</i> DH1	Wildtyp, axenisch, $\Delta pyr5-6$ , daher ura(-)	Dictybase/DBS0235696
--	--	----------------------

Zell-Linie	Charakteristika	Referenz
<i>Dictyostelium discoideum</i> DH1 ( $\Delta pipA$ )	Phospholipase C- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> DH1, ura(+)	Keizer-Gunnik <i>et al.</i> , 2007 Dictybase/DBS0236793
<i>Dictyostelium discoideum</i> NC4A2	Wildtyp, axenisch	Dictybase/DBS0236602
<i>Dictyostelium discoideum</i> NC4A2 ( $\Delta lvsB$ )	LvsB- Deletionsmutante von <i>D. d.</i> NC4A2, Bs <sup>R</sup>	Cornillon <i>et al.</i> , 2002 Dictybase/DBS0236521
Lungenepithelzellen NCI-H292	Epithelzellen aus humanem mukoepidermoidem Lungenkarzinom	ATCC CRL-1848 <sup>TM</sup>

Bei Stämmen, die von der Dictybase-Stammsammlung bezogen wurden, ist die jeweilige DBS-Nr. angegeben. Bs<sup>R</sup> (Blasticidinresistenz), G418<sup>R</sup> (G418-Resistenz), ura(-) (Uracil-Auxotroph in definiertem Medium).

## 2 Kultivierung von Bakterien

Flüssigmedien und halbfeste Medien für die Kultur von Bakterien und Amöben wurden durch Autoklavieren bei 121 °C für 15 min sterilisiert. Zusätze wurden sterilfiltriert (0,22 µm-Filter von Millipore) und den Medien nach ihrem Abkühlen auf ca. 40-50 °C hinzugefügt.

Die Bakterienzahl wurde standardmäßig mit Hilfe der optischen Dichte bei 550nm (OD<sub>550</sub>) bestimmt und nach der folgenden Formel in cfu/ml umgerechnet:

$$0,1114x^2 + 0,5448x + 0,0813 = y,$$

wobei x der gemessene OD<sub>550</sub>-Wert ist und y die entsprechende Zelldicht in cfu/ml ist. Es wurde darauf geachtet, dass die gemessene OD<sub>550</sub> zwischen 0,3 und 0,8 Einheiten lag. Die Bakteriensuspensionen wurden dementsprechend verdünnt.

## 2.1 Kultivierung und Konservierung von *Legionella pneumophila*

*L. pneumophila* wurde auf BCYE-Agar bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 3 Tage bis zur stationären Phase kultiviert. Die Bakterien benötigen Eisen und L-Cystein für ein besseres Wachstum. Deshalb wurde das halbfeste Medium nach dem Autoklavieren mit 0,25 % (w/v) Fe(III)NO<sub>8</sub>·9H<sub>2</sub>O sowie 0,4 % (w/v) L-Cystein ergänzt. Zudem wurde das Medium für das Neutralisieren von Radikalen, die während des Autoklavierens entstehen, mit 2 % (w/v) Aktivkohle versetzt. Für die Kultivierung von *L. pneumophila* JR32-2 wurde das Medium mit 12,5 µg/ml Kanamycin ergänzt. Für die Konservierung wurden 1.200 µl Bakteriensuspension von einer 3 Tage alten Plattenkultur hergestellt, mit 600 µl 86 %igem Glycerin versetzt und in Cryoröhrchen bei -80 °C aufbewahrt.

### BCYE-Agar

4 g ACES (Gerbu)

8 g Hefeextrakt (BD Difco)

ad. 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (pH 6,9 mit 10 N KOH)

1,6 g Aktivkohle (Fluka)

12 g Agar (BD Difco)

zugeben und autoklavieren. Nach dem Abkühlen

0,4 g L-Cystein (AppliChem) in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

0,25 g Fe(III)NO<sub>8</sub>·9H<sub>2</sub>O (AppliChem) in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

hinzufügen.

## 2.2 Kultivierung und Konservierung von *Mycobacterium marinum*

Für die Kultur von *M. marinum* wurde 7H9-Medium sowie 7H11-Agar verwendet. Die Kultur in 7H9-Medium erfolgte für 3 Tage bei 30 °C und 170U/min, während die Kultur auf 7H11-Agar für 7-10 Tage bei 30 °C und 5-10 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre geschah. Für Versuche wurde eine Vorkultur hergestellt, indem in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben 10 ml 7H9-Medium mit Bakterien aus einem Glycerinstock inokuliert und 3 Tage bei 30 °C und 170 U/min geschüttelt

wurden. Diese Vorkultur wurde bis zu 1 Monat bei 4 °C aufbewahrt. Wenn nötig wurde eine frische 10 ml Kultur hergestellt, indem eine 1:30-1:100-Verdünnung aus der Vorkultur in 10 ml frischem 7H9-Medium hergestellt und 3 Tage bei 30 °C und 170 U/min geschüttelt wurden. Für die Kultivierung von *M. marinum* P1 wurden dem Medium 30 µg/ml Kanamycin hinzugefügt. Für die Konservierung wurden 1.200 µl Flüssigkultur mit 600 µl 86 %igem Glycerin versetzt und in Cryoröhrchen (Greiner) bei -80 °C aufbewahrt.

#### 7H9-Medium

4,7 g 7H9-Mischung (BD Difco)  
2 % (v/v) Glycerin  
ad. 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
autoklavieren und nach dem Abkühlen  
100 ml ADC-Lösung  
hinzufügen

#### 7H11-Agar

21 g 7H11-Mischung (BD-Difco)  
5 % (v/v) Glycerin  
ad. 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
autoklavieren und nach dem Abkühlen  
100 ml OADC-Lösung  
hinzufügen

### 3 Zellkultur

#### 3.1 Kultivierung und Konservierung von *Dictyostelium discoideum*

Für die Kultur von *D. discoideum* wurde HL5-Medium verwendet. Da bei dem haploiden Organismus *D. discoideum* häufig Spontanmutationen auftreten, wurden die Amöben nicht kontinuierlich weiterkultiviert. Stattdessen wurde ein Vorrat an gefrorenen Sporen oder Zellen angelegt. Aus diesen wurde regelmäßig eine Vorkultur hergestellt, indem in N<sub>2(0)</sub> eingefrorene 1 ml

Sporenlösung auf Raumtemperatur gebracht, und mit 25 ml HL5-Medium in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Falcon™, #353135) gegeben wurde. Innerhalb von drei Tagen bei 24,5 °C keimen diese Sporen, und es entsteht die unizelluläre Amöbenkultur, die für weitere 14 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden kann. Nach dieser Zeit wurde bei Bedarf eine neue Vorkultur hergestellt.

Eine Hauptkultur wurde durch Animpfen von 25 ml HL5 mit 1,5 ml Vorkultur in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (Standkultur) bzw. 100 ml HL5 mit 5–10 ml Vorkultur in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben (Schüttelkultur) angesetzt. Standkulturen wurden drei Tage in einem Klimaschrank bei 24,5 °C inkubiert, während Schüttelkulturen bei 3–4 Tage bei 21 °C und 130 U/min geschüttelt wurden. Für größere Schüttelkulturen wurde zunächst eine 20 ml Vorkultur in Erlenmeyerkolben hergestellt. 10–20 ml dieser 3 Tage alten Kultur wurden für das Animpfen von 300 ml HL5 in einem 1 l-Erlenmeyerkolben verwendet. Wenn nötig wurden 10 µg/ml Blastocidin und/oder 5 µg/ml G418 für die Kultur von Mutanten verwendet.

Die Aufbewahrung von *D. discoideum* für längere Zeit erfolgt am Besten in Sporenform, da diese sehr einfach zu handhaben ist. Dafür wurde je nach Bedarf eine 100–300 ml Schüttelkultur hergestellt. Nach 3–4 Tagen wurden die Zellen geerntet (RT, 200 g, 7 min) und anschließend in 1x Soerensenpuffer so aufgenommen, dass eine Zelldichte von mindestens 10<sup>7</sup> Zellen/ml erreicht wurde. Je 400 µl dieser Suspension wurden auf Soerensen-Agarplatten gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Die Platten wurden anschließend bei 21 °C 3–4 Tage inkubiert. Dabei wurde gewährleistet, dass sie während dieser Zeit nicht austrocknen konnten sowie mit dem Deckel nach oben lagen. Die gebildeten Sporenköpfe wurden mit je 2 ml 1x Soerensenpuffer abgeschwemmt und in 1 ml Aliquots in Cryoröhrchen (Greiner) verteilt und direkt in einen N<sub>2</sub>(l)-Tank überführt.

Manche Mutationen verursachen eine Störung des Sporulationsprozesses, sodass entweder gar keine Sporen gebildet werden können oder die Sporenausbeute sehr gering ausfällt. In diesem Fall mussten die Stämme als Zellen eingefroren werden. Die Kultur erfolgte wie bei der Herstellung von Sporen. Anschließend wurde wie bei den NCI-H292-Zellen vorgegangen, mit

der Ausnahme, dass HL5-Medium anstelle des Zellkulturmediums verwendet wurde.

#### HL5-Medium

14,3 g Proteose Pepton No. 2 (BD Difco)

7,15 g Hefeextrakt (BD Difco)

1,28 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\rightarrow$  9 mM)

0,49 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\rightarrow$  3 mM)

ad. 900 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  (pH 7,5 mit 10 N KOH)

15,4 g Glukose ( $\rightarrow$  85 mM) in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  lösen, getrennt autoklavieren und beide Lösungen nach dem Abkühlen vereinen.

#### 50 x Soerensenpuffer

99,86 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\rightarrow$  734 mM)

17,80 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\rightarrow$  125 mM)

ad. 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

1x Soerensenpuffer wird durch eine 1:49 Verdünnung gewonnen und entspricht einem 17 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ -Puffer mit einem pH von 6,0

### 3.2 Kultivierung und Konservierung von *Acanthamoeba castellanii* C3

*Acanthamoeba castellanii* C3 wurde mit PYG-Medium in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Falcon™, #353135) kultiviert. Die Zellen wurden ein- bis zweimal die Woche gesplittet und die Kultur somit ständig aufrechterhalten. Die Zellen wurden in PYG versetzt mit 5 % (v/v) DMSO in  $\text{N}_{2(l)}$  eingefroren. Für Details siehe Konservierung von *D. discoideum* bzw. NCI-H292.

#### PYG-Medium mit 100 mM Glukose

1 g  $\text{Na}_3$ -Citrat

1 g Hefeextrakt (BD Difco)

20 g Proteose Pepton (BD Difco)

10 ml 0,40 M  $\text{MgSO}_4$

10 ml 0,25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

10 ml 0,25 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$



8 ml 0,05 M  $\text{CaCl}_2$

ad. 940 ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

18 g Glukose in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  lösen, getrennt autoklavieren und nach dem Abkühlen zusammen mit 10 ml einer sterilfiltrierten 0,005 M  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung dem Medium hinzufügen.

#### 1x Amoebenpuffer

1 g  $\text{Na}_3$ -Citrat

8 ml 0,05 M  $\text{CaCl}_2$

10 ml 0,40 M  $\text{MgSO}_4$

10 ml 0,25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

10 ml 0,25 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

ad. 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

nach dem Autoklavieren 10 ml einer sterilfiltrierten 0,005 M  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung hinzufügen.

### **3.3 Kultivierung und Konservierung von NCI-H292**

#### **Lungenepithelzellen**

Die Lungenepithelzell-Linie NCI-H292 wurde bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Als Medium wurde RPMI-1640 mit zusätzlich 2 mM L-Glutamin und Phenolrot (PAA), das mit 10 % (v/v) FCS (PAA) ergänzt wurde, verwendet. Das FCS wurde vor der Zugabe weder sterilfiltriert noch durch Hitze inaktiviert. Die Kultivierung erfolgte in 75  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflaschen (Falcon™, #353136). Die Zellen wurden kurz vor oder nach dem Erreichen der Konfluenz gesplittet. Hierzu wurde das alte Medium abgekippt und durch 5 ml Trypsin/EDTA ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ , bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Die Trypsinisierung wurde durch die Zugabe von 5 ml frischem RPMI-Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert (100 g, 5 min, RT) und in 10 ml frischem RPMI aufgenommen. Um die Zellen weiter zu kultivieren, wurden 1-2 ml dieser Suspension in eine neue 75  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche mit frischem RPMI-Medium gegeben und bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Für die Stammhaltung wurden die Zellen nach der Trypsinisierung und der Zentrifugation so in frischem Medium aufgenommen, dass eine Zelldichte von mindestens  $10^8$  Zellen/ml erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen für ca. 10 min auf Eis gestellt. Nachdem die Zellen abgekühlt waren, wurde vorsichtig und unter leichtem Schwenken DMSO (SigmaAldrich) so dazugegeben, dass am Ende eine DMSO Konzentration von 1 % (v/v) erreicht war. Aliquots von 1 ml wurden in Cryoröhrchen (Greiner) mit Innengewinde pipettiert und für 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden konnten.

Zum Ansetzen einer frischen Kultur wurden die eingefrorenen Zellen rasch bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes RPMI-Medium in einer  $25\text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche gegeben, um die toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen zu verringern. Die Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Sobald die ersten Zellen am Boden der Zellkulturflasche hafteten, wurde das DMSO-haltige Medium abgekippt und durch frisches Medium ersetzt.

## 4 Infektionsstudien

### 4.1 Infektion von *Dictyostelium discoideum* mit *Legionella pneumophila*

*D. discoideum* wurde in dieser Arbeit nach zwei unterschiedlichen Methoden infiziert, die unten vorgestellt sind. Die grundsätzlichen Unterschiede der beiden Methoden ist, dass in der ersten die Infektion in einer  $25\text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,02 während in der zweiten die Infektion in einer 24-Well-Platte (Falcon™, #353047) mit einer MOI von 10 durchgeführt wird. Es wird in der ersten Variante auf das Entfernen von extrazellulären Bakterien verzichtet. In der zweiten Variante hingegen werden die extrazellulären Bakterien nach 3 h mit Hilfe von Gentamicin getötet und anschließend abgewaschen. In dieser Arbeit ist nur die Infektion der *cap::bsr*-Mutante und dessen Wildtyp nach der ersten Variante erfolgt. Alle Infektionen wurden grundsätzlich mit *D. discoideum* AX2 durchgeführt. Ausnahmen wurden

gemacht, wenn eine Mutante in einem anderen Wildtyp-Hintergrund hergestellt worden war. In diesem Fall wurde der jeweilige Wildtyp verwendet.

Die Infektion in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche: In dieser Variante stellt jede Flasche einen Infektionsansatz dar. Die Vermehrung der Bakterien über die Infektionsdauer wird also durch Entnahme von Aliquots aus derselben Flasche zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewährleistet. Hierfür wurden die Dictyostelien wie in III.3.1 beschrieben kultiviert und durch Abklopfen geerntet, zentrifugiert und zweimal mit je 20 ml Soerensenpuffer gewaschen (200 g, 7 min, RT). Die Zellzahl wurde nach der Ernte auf  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden je 5 ml Zellsuspension in die jeweilige Zellkulturflasche gegeben. Pro getesteten Stamm wurden in jeder Infektion je zwei Fläschchen angesetzt. Drei Tage alte *Legionella*-Plattenkulturen wurden in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> suspendiert, die optische Dichte bei 550 nm bestimmt, und anhand dieser die Bakterienzahl auf  $10^6$  Bakterien/ml eingestellt. 50 µl dieser Suspension wurden in jedes Fläschchen gegeben (MOI 0,02). Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen durch Abklopfen suspendiert, und es wurde ein 200 µl Aliquot aus jedem Ansatz entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (12.000 g, 6 min, RT) und Vortexen aufgeschossen. Es wurden Verdünnungen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> hergestellt, Aliquots zur cfu-Bestimmung auf BCYE-Platten ausplattiert und 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Infektion in einer 24-Well-Platte: Für die Infektion wurden 25 ml HL5 Medium mit 1,5 ml Vorkultur des jeweiligen Stammes angeimpft und in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Falcon™, #353135) für 3 Tage bei 24,5 °C auf eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml gezüchtet. Die Zellen wurden durch Abklopfen geerntet, zentrifugiert und zweimal mit je 20 ml Soerensenpuffer gewaschen (200 g, 7 min, RT). Anschließend wurde die Zellzahl im Infektionsmedium (ein 1:1 Gemisch aus HL5 und 1x Soerensenpuffer) auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 300 µl dieser Suspension wurden in die Vertiefungen einer 24 Wellplatte gegeben. Die Zellen wurden 30 min bei 25,5 °C gelassen, sodass sie sedimentieren konnten. *L. pneumophila* Corby wurde auf BCYE-Agar für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gezüchtet. Die Bakterien wurden mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> abgeschwemmt und im Infektionsmedium auf  $1 \cdot 10^7$  cfu/ml eingestellt. Nachdem die Dictyostelien sedimentiert waren, wurde das Medium durch je 300

µl des Infektionsmediums mit Bakterien ersetzt (MOI 10). Nach 3 h bei 25,5 °C wurde der Überstand erneut entfernt, extrazelluläre Bakterien durch Waschen einmal mit 1x Soerensenpuffer und einmal mit Infektionsmedium (mit 100 µg/ml Gentamicin) entfernt und die Zellen für 45 min bei 25,5 °C mit frischem Infektionsmedium (mit 100 µg/ml Gentamicin) inkubiert, um die verbliebenen extrazellulären Bakterien zu töten. Die getöteten Bakterien und das überschüssige Gentamicin wurden durch zweimaliges Waschen mit Soerensenpuffer entfernt. Die Zellen wurden für den Rest der Infektion mit je 1 ml Infektionsmedium bedeckt. Zu den angegebenen Zeitpunkten (der 3 h-Wert entspricht der Bakterienzahl unmittelbar nach Gentamicin-Behandlung) wurden die Zellen durch Abkratzen und mehrmaliges Pipettieren geerntet und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (12.000 *g*, 6 min, RT) und Vortexen aufgeschlossen. Es wurden Verdünnungen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> hergestellt, Aliquots zur cfu-Bestimmung auf BCYE-Platten ausplattiert und 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.2 Infektion von *Dictyostelium discoideum* mit *Mycobacterium marinum*

Die Infektion von *D. discoideum* mit *M. marinum* wurde in zwei Varianten durchgeführt. Die erste Variante im 24-Well-Plattenformat diente der Bestimmung der Vermehrungsrate von *M. marinum* in *D. discoideum* und ähnlich der Infektion mit *L. pneumophila*. Die zweite Variante in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen diente der Isolation von mRNA aus infizierten Dictyostelien, um anschließend Transkriptomstudien mit Hilfe eines RNA-Microarrays durchführen zu können. Für die Infektionen wurde darauf geachtet, dass die *M. marinum*-Kulturen eine OD<sub>550</sub> von 0,3-0,5 hatten, da sie in diesem Zustand viel weniger verklumpen als bei einer höheren OD<sub>550</sub>. Dies erleichtert die Handhabung der Bakterien und ermöglicht die genauere Einstellung der Infektionsdosis. Da Mycobakterien im Gegensatz zu Legionellen in der Lage sind im Infektionsmedium sich extrazellulär zu vermehren, ist der Einsatz eines Antibiotikums wie Streptomycin während der Infektion nötig. Dies wurde nach 5

h des Beginns der Infektion dazugegeben, um die Aufnahme vitaler Bakterien zu ermöglichen.

Für die Infektion in 24-Well-Platten wurde *D. discoideum* AX2 wie unter III.3.1 beschrieben vorbereitet und in 24-Well-Platten vorgelegt, wobei auf ein Waschen mit Soerensenpuffer verzichtet wurde. *M. marinum*-Kulturen (siehe III.2.2) wurden geerntet und zweimal mit je 10 ml 1x Soerensenpuffer gewaschen (500 g, 7 min, RT). Die Zellzahl wurde bei OD<sub>550</sub> bestimmt und im Infektionsmedium auf 10<sup>7</sup> Bakterien/ml eingestellt. Je 300 µl dieser Suspension wurden für die Infektion von *D. discoideum* verwendet (MOI 10). Nach 5–6 h wurden die Zellen zweimal mit 1x Soerensenpuffer und einmal mit Infektionsmedium mit 5 µg/ml Streptomycin gewaschen, um extrazelluläre Bakterien zu entfernen. Die Zellen wurden für den Rest der Infektion mit je 1 ml Infektionsmedium mit 5 µg/ml Streptomycin bedeckt. Zu den erwünschten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und wie unter III.4.1 beschrieben aufgeschlossen. Die Verdünnungen wurden in 1x PBS mit 0,1 % (v/v) TritonX 100 durchgeführt, um ein Verklumpen der Mycobakterien zu reduzieren. Alternativ wurden die Zellen auch aufgeschlossen ohne zu zentrifugieren. In diesem Fall wurden 100 µl der geernteten Zellen direkt in 900 µl 1x PBS mit 0,1 % (v/v) TritonX 100 überführt gevortext und weiter verdünnt.

Für die Infektion in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen wurde eine Schüttelkultur von *D. discoideum* AX2 wie unter III.3.1 beschrieben hergestellt und geerntet, wobei auf das Waschen mit Soerensenpuffer verzichtet wurde. Die Zellzahl wurde im Infektionsmedium auf 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Je 15 ml dieser Suspension wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Falcon™, #353135) überführt. *M. marinum*-Kulturen (siehe III.2.2) wurden geerntet und zweimal mit je 10 ml 1x Soerensenpuffer gewaschen (500 g, 7 min, RT). Die Zellzahl wurde bei OD<sub>550</sub> bestimmt und im Infektionsmedium auf 10<sup>7</sup> Bakterien/ml eingestellt. Je 150 µl dieser Suspension wurden in jede Zellkulturflasche gegeben (MOI 10). Nach 5 h wurde das Medium vorsichtig abgekippt und die Zellen in der Flasche zweimal mit je 10 ml 1x Soerensenpuffer und einmal mit 10 ml Infektionsmedium mit 5 µg/ml Streptomycin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für den Rest der Infektion mit 15 ml Infektionsmedium mit 5 µg/ml Streptomycin bedeckt.

### 4.3 Amöbenpassage von *Legionella pneumophila* Corby

Da während der Aufbewahrung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bei den Legionellen eine gewisse Abschwächung der Virulenz beobachtet werden kann, wurde einmal im Jahr eine Amöbenpassage durchgeführt. Dies erhöht nachgewiesener Weise die Invasion und Virulenz der Bakterien [Cirillo *et al.*, 1994 und 1999].

Für die Passage wurde eine *A. castellanii*-Kultur in einer  $75\text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche (Falcon™, #353135) hergestellt (siehe III.3.2). Das Medium wurde vorsichtig abgekippt. Die Zellen wurden dann in der Flasche einmal mit 10 ml Amöbenpuffer gewaschen und anschließend mit 10 ml frischem Amöbenpuffer abgeklopft. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und in Amöbenpuffer auf  $10^5$  Zellen/ml eingestellt. 5 ml dieser Suspension wurden in eine  $25\text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche (Falcon™, #353014) gegeben. Nachdem die Zellen adhäriert waren, wurden 50  $\mu\text{l}$  einer auf  $10^5$  Bakterien/ml eingestellten Bakteriensuspension hinzugefügt (MOI 0,01) (siehe III.4.1). Nach einer Infektionszeit von 48–72 h wurden die Zellen abgeklopft, 500  $\mu\text{l}$  entnommen und mechanisch aufgeschlossen (siehe III.4.1). Je 100  $\mu\text{l}$  dieser Probe wurden unverdünnt auf BCYE-Platten ausplattiert. Die nach drei Tagen gewachsenen Bakterien wurden mit 1–2 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  abgeschwemmt und wie in III.2.1 beschrieben konserviert. Bei der Amöbenpassage ist zu beachten nicht Legionellen einer bereits passagierten Kultur zu verwenden, da dies unter Umständen zu einer Selektion amöbenspezifischer Virulenzfaktoren führen könnte. Daher sollten immer Legionellen aus demselben Urstock für die Passage verwendet werden. Ebenso sollte vermieden werden Vergleiche zwischen einem passagierten Wildtyp und dessen vor der Passage hergestellten Mutante zu machen. Es wäre ratsam wenn überhaupt eine Passage vor einer Mutagenese durchzuführen.

### 4.4 Transwell-Assay

Das Transwell-Assay ist in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt werden am Tag 0 die Zellen und Bakterien für den Assay vorbereitet und für

zwei Tage gezüchtet. Durch einen Mediumwechsel am Tag 2 und die Kultivierung für einen weiteren Tag soll die Entstehung einer intakten Barriere gewährleistet werden. Am Tag 3 wird der eigentliche Assay durch die Zugabe der Bakterien auf die Zellen durchgeführt.

#### **Tag 0-2:**

Eine konfluente NCI-H292 Zellkultur wurde nach der Entnahme des Mediums mit 5 ml Trypsin-EDTA (PAA) ca. 20 min bei 37 °C vom Boden gelöst und nach Zugabe von 5 ml frischem Medium in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden pelletiert (100 g, 5 min, RT) und in frischem Medium auf  $10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml frisches Medium wurde in die benötigte Anzahl Löcher einer 24 Well-Platte (Falcon™) gefüllt. Anschließend wurden die Transwell-Einsätze (Falcon™, #353096) mit einer sterilen Pinzette in die vorgesehenen Löcher vorsichtig platziert. Je 200 µl der zuvor hergestellten Zellsuspension wurden in jeden Einsatz pipettiert. Um das Wachstum mikroskopisch beobachten zu können, wurden pro Experiment 3 Löcher mit Medium aber ohne Einsatz vorbereitet, in die ebenfalls 200 µl der Suspension gegeben werden. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für zwei Tage inkubiert. Zusätzlich wurden am ersten Tag Ausstriche der benötigten *Legionella*-Stämme hergestellt und diese ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach 48 h wurde eine neue Platte mit frischem Medium vorbereitet (1 ml pro Loch). Die Einsätze wurden nach Abkippen des alten Mediums in diese Platte überführt und mit je 200 µl frischem Medium befüllt.

#### **Tag 3:**

Die Bakterien wurden in 1 ml 1x PBS (pH 7,3) aufgenommen und in RPMI mit L-Glutamin und Phenolrot aber ohne weiteren Zusätzen (Assay-Medium) auf  $5 \cdot 10^7$  Bakterien/ml eingestellt. Bei Zugabe von Substanzen, die die Transmigration inhibieren sollen, wurden diese mit der erwünschten Endkonzentration zu der jeweiligen Bakteriensuspension gegeben und die Bakterien für mind. 20 min bei 37 °C mit den Substanzen inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Während der Inkubation wurden die Suspensionen mehrmals leicht gewendet, sodass stets eine gute Vermischung der Bakterien und der Substanzen gewährleistet war.

Die Einsätze wurden gelehrt und in eine neue 24-Well-Platte mit je 500 µl Assay-Medium pro Einbuchtung überführt. In jeden Einsatz kamen dann je 200 µl der erwünschten Bakteriensuspension, so dass pro Einsatz ca.  $10^7$  Bakterien/ml vorliegen sollten. Die Zellen und die Bakterien wurden anschließend 5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Zur Bestimmung der cfu zu  $t_0$  wurden Verdünungen der hergestellten Suspensionen ausplattiert.

Nach 5 h wurde die Anzahl der Bakterien, die durch die Epithelbarriere wandern konnten bestimmt, indem die Einsätze vorsichtig entfernt Verdünungen aus jedem Loch ausplattiert wurden (typischer Weise  $10^0$ – $10^{-2}$ ).

10x PBS

1,37 M NaCl

27 mM KCl

43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ergibt einen pH von 7,3 wenn in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1x PBS verdünnt wird.

## 5. Mikroskopische Methoden

### 5.1 Färbung von Mycobakterien während der Infektion

Die Infektion wurde vorbereitet wie für die RNA-Isolierung (15 ml  $10^6$  Dictyostelien/ml + 150 µl  $10^9$  Bakterien/ml). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, indem die Zellen abgeklopft wurden. Proben von 20–30 µl werden auf jeweils ein Feld eines 6-Feld Objektträgers gebracht und in einer feuchten Kammer bei RT für mindestens 20 min inkubiert, in denen die Zellen auf die Glasfläche sedimentieren. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einer 1:100 in 1x Soerensenpuffer verdünnten Rhodamin B-Lösung einmal gewaschen und dann für 15–20 min im Dunkeln und bei RT inkubiert. Danach wurde das Rhodamin B entfernt und die Zellen einmal mit 70 % (v/v) Ethanol mit 0,5 % (v/v) HCl gewaschen und für 10 min mit dieser Lösung bedeckt. Anschließend wurde die Hintergrundfluoreszenz durch Bedecken der Zellen mit einer 0,5 %igen (w/v) KmnO<sub>4</sub>-Lösung in 1x Soerensen für 1–2 min reduziert. Anschließend wurde ein- bis zweimal mit 1x Soerensen



gewaschen, die Zellen mit einer in 1x Soerensen auf 5 µg/ml eingestellten DAPI-Lösung für 5–10 min bedeckt und zuletzt mit 100 %igem Ethanol in drei Schritten entwässert, luftgetrocknet und mit Citifluor bedeckt.

#### Rhodamin B-Stocklösung

10 mg/ml Rhodmain B (SigmaAldrich, R6626) in DMSO, Aufbewahrung bei 4 °C

#### DAPI-Stocklösung

5 mg/ml DAPI (Invitrogen, D1306) in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, Aufbewahrung bei –20 °C

### **5.2 Rhodamin-Färbung von Oberflächen von Bakterien**

Eine in 1 ml 1x PBS auf 10<sup>9</sup> Bakterien/ml eingestellte Suspension wurde mit 300 mM Rhodamin versetzt und 30–60 min bei RT und im Dunkeln geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (5.000 g, RT, 2 min) und in 1 ml 50 mM Tris·Cl (pH 7,5) resuspendiert, um das ungebundene Rhodamin zu sättigen, und erneut zentrifugiert (5.000 g, RT, 2 min). Dieser Schritt wurde 1 bis 2-mal wiederholt, bis kein Farbstoff im Überstand mehr vorlag. Danach wurden die Bakterien einmal mit 1x PBS gewaschen, um das Tris zu entfernen, und in 1 ml frischem 1x PBS resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde dann die benötigte Verdünnung in Infektionsmedium hergestellt.

#### Rhodamin-Stocklösung

10 mM 5(6)-Carboxy-rhodamine-N-succinimidylester  
(SigmaAldrich, #21966) in DMSO, Aufbewahrung bei 4 °C möglichst im Dunkeln.

### **5.3 Transmissionselektronenmikroskopie von infizierten Dictyostelien**

Die Infektionen für die Tansmissionselektronemikroskopie (TEM) wurden in 24-Well-Platten angesetzt, in die zuvor runde Deckgläschen platziert worden waren. Für *D. discoideum* ist keine spezielle Vorbehandlung der Deckgläschen nötig, da die Zellen von sich aus an diese gut haften. Sie wurden lediglich hitzesterilisiert.

*D. discoideum* und die Bakterien wurden wie bereits beschrieben vorbereitet (siehe III.4.1 sowie III.4.2). Je 500 µl einer auf  $10^6$  Zellen/ml eingestellten *Dictyostelium*-Suspension wurden in jedes Well gegeben. Nach ca. 30 min, in denen die Zellen auf die Deckgläschen sedimentieren konnten, wurde das Medium durch je 500 µl Bakterien-haltigem Infektionsmedium ersetzt. *L. pneumophila* wurde mit einer MOI von 50, *M. marinum* mit einer MOI von 10 eingesetzt. Zu den erwünschten Zeitpunkten wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 1x Soerensenpuffer gewaschen und anschließend mit Fixierlösung für 2 h bei RT oder ÜN bei 4 °C fixiert. Nach der Primärfixierung wurden die Zellen mit 20 mM Cacodylat-Puffer gewaschen, mit einer 2 %igen (w/v)  $\text{OsO}_4$ -Lösung bedeckt und zur Fixierung der Lipide für 30–60 min auf Eis bewahrt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  bedeckt bei 4 °C aufbewahrt. Ansonsten wurde mit der Entwässerung mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 5 min 50 %, 70 %, 90 %, 96 % und 100 %) auf Eis fortgefahren. Dann wurden die Deckgläschen bei RT für 5 min in 100 % Ethanol und zweimal für je 5 min Propylenoxid (SigmaAldrich) überführt. Danach wurden sie für 2 h in ein 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und EPON und anschließend über Nacht bei RT in EPON eingelegt. Am nächsten Tag wurden leere Pillenkapseln mit EPON befüllt, auf die Deckgläschen gestülpt und die Präparate 2–3 Tage bei 60 °C ausgehärtet. Nach dem Aushärten wurden die Deckgläschen mit Hilfe von Flüssigstickstoff und Druckluft gesprengt, sodass die Zellen auf dem EPON-Block kleben blieben. Aus dem Block wurden Ultradünnschnitte hergestellt, die mit 0,5 % (w/v) Uranylacetat nachkontrastiert wurden und mit Hilfe eines Zeiss 10A TEMs.

#### Fixierlösung (Primärfixierung)

20 mM Na-Cacodylat

2,5 % (v/v) Glutaraldehyd (25 %ige Stocklösung von SigmaAldrich)

1 % (v/v) Formaldehyd (37 %ige Stocklösung von SigmaAldrich)

Die Fixierlösung wird frisch aus 100 mM Na-Cacodylat-Trihydrat (AppliChem, A2140) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  (pH 7,2 mit HCl), Glutaraldehyd und Formaldehyd in benötigter Menge hergestellt. Da Glutaraldehyd und Formaldehyd in wässriger Lösung sauer reagieren, sollte der pH am Ende

mit pH-Papier überprüft werden und nicht unter 6 liegen. Solange der pH nicht unter 6 lag, wurde er nicht nachgestellt.

#### OsO<sub>4</sub>-Stocklösung (Sekundärfixierung)

4 % (w/v) OsO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen und bei -20 °C aufbewahren.

### **5.4 Lebendzellaufnahmen von Coronin7-GFP-Mutanten**

*D. discoideum* AX2 Zellen, die ein Coronin7-GFP-Fusionsprotein exprimieren, wurden wie unter III.4.1 beschrieben für die Infektion vorbereitet, und je 400 µl wurden in Chamberslides (Nunc™, #155382) ausgesät. Bakterien wurden wie unter III.5.2 mit Amin-reaktivem Rhodamin markiert und in einer MOI von 50 den Zellen hinzugefügt. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Zellen anschließend mit Hilfe eines inversen konfokalen Mikroskops lebend angeschaut. Das GFP wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm und Rhodamin mit einer Wellenlänge von 543 nm angeregt. Es wurde ein 40x/1,3 Plan-Neofluar Ölimmersionsobjektiv von Zeiss verwendet. Das Pinhole wurde so eingestellt, dass die optische Schnittdicke zwischen 0,8 und 1,4 µm lag. Die Aufnahmen wurden mit einer Auflösung von 512x512 dpi durchgeführt. Bei Lebendaufnahmen wurde die Aufnahme von Bakterien und die Lokalisation von Coronin7-GFP mit Hilfe von 45-60 hintereinander durchgeführten Aufnahmen beobachtet, die alle 15-20 sec gemacht wurden.

### **6. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Dictyostelium discoideum***

*D. discoideum* AX2 wurde wie unter III.4.2 beschrieben in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit *M. marinum* infiziert. Die Zellen wurden durch Abklopfen geerntet. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Qiagen Rneasy-Midikits und des beigelieferten Protokolls zur Isolation zytoplasmatischer RNA gewonnen. Für die Lyse der Plasmamembran wurde wie im Protokoll empfohlen ein RLN-Puffer angesetzt, der vor der Lyse frisch mit 1 mM DTT versetzt wurde. Auf die Zugabe von RNase-Inhibitoren wurde verzichtet. Die Konzentration der

gewonnenen Gesamt-RNA wurde durch eine photometrische Messung bei 260 nm bestimmt. Zudem wurde der 260nm/280nm-Wert bestimmt, um den Anteil der RNA in der Lösung qualitativ zu bestimmen. Die Werte lagen erfahrungsgemäß zwischen 2,22 und 2,28, was für eine gute Ausbeute sprach.

## 7. Proteinbiochemische Methoden

### 7.1 Gelelektrophorese zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe wurde die eindimensionale Gelelektrophorese eingesetzt, bei der mit SDS denaturierte und mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduzierte Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt wurden. Dafür wurden die Proteinlösungen im Verhältnis 1:3 mit 4x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 98 °C aufgeköcht und anschließend in die Taschen eines Polyacrylamidgels bestehend aus einem 5 %igen Sammelgel und einem 12 %igen Trenngel geladen. Die Gelkammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA/Gel und RT.

#### 12 %iges Trenngel (ergibt ein 6 ml Gel von 6 cm x 8 cm)

2,4 ml Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth, #3029.1)

1,5 ml 1,5 M Tris·Cl (pH 8,8)

2,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

60 µl 10 % (w/v) SDS

30 µl 10 % (w/v) APS

3,75 µl TEMED

#### 5 %iges Sammelgel (ergibt zwei Sammelgele)

665 µl Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth, #3029.1)

1 ml 0,5 M Tris·Cl (pH 6,8)

2,185 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

40 µl 10 % (w/v) SDS

20 µl 10 % (w/v) APS

2,5 µl TEMED

5x SDS-Laufpuffer

15,1 g Tris

72 g Glycin

5 g SDS

ad. 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

4x Probenpuffer

8 % (w/v) SDS

40 % (v/v) Glycerin

250 mM Tris·Cl (pH 6,8)

20 % (v/v) β-Mercaptoethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

## 7.2 Nachweis von Mip mit Hilfe von Western-Blotting

Zum Nachweis von Mip in Proteingemischen oder -fraktionen wurden diese nach der Auftrennung in einem Polyacrylamidgel (siehe III.7.1) auf Nitrocellulosemembranen (Schleicher&Schuell, #10439196) transferiert und anschließend mit dem Antikörper 2D8 und einem HRP-gekoppelten α-Maus-Antikörper nachgewiesen. Für den Transfer wurde ein semi-dry Blotter von Peqlab verwendet. Alle Materialien wurden im Transferbuffer getränkt. Der Transfer geschah bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 75 min. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 3 % (w/v) entfettetem Milchpulver (AppliChem) in 1x PBS bei RT für 30 min geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper 2D8 (1:1.000 verdünnt in 1x PBS mit 1 % (w/v) Milchpulver) für 2h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde dreimal mit je 20 ml 1x PBS abgewaschen, und der Blot anschließend mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (1:25.000 verdünnt in 1x PBS mit 1 % (w/v) Milch) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem erneuten Abwaschen des ungebundenen Antikörpers wurde der Blot mit dem Lumigen™ TMA-6 Substratkit (GE Healthcare) bedeckt und in einem Chemilumineszenz

Imager analysiert. Alternativ wurde das Signal auch mit Hilfe eines Films (Amersham Hyperfilm™ ECL) detektiert. Dafür wurde der Film ca. 15 sec mit dem Blot belichtet und anschließend mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt.

Transferpuffer

25 mM Tris·Cl (pH 8,3)

150 mM Glycin

10 % (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

### **7.3 Identifizierung einer Mip-Bindungssequenz in Collagen IV**

Die Identifizierung einer Mip-Bindungssequenz in Collagen IV erfolgte mit Hilfe der Peptid-Array-Strategie. Dafür wurden die Primärsequenzen von Collagen IV α1 und α2 von N-Terminus beginnend in 13mer Oligopeptide unterteilt, wobei jedes Peptid entlang der Primärsequenz um drei Aminosäuren in Richtung des C-Terminus verschoben wurden. Somit überlappten aufeinander folgende Oligopeptide jeweils über eine Sequenz von 10 Aminosäuren. Die Peptide wurden auf 7 cm x 11 cm großen Cellulose Membranen mit Hilfe der SPOT™-Technologie [Frank *et al.*, 1990, Frank, R., 1992] Roboter gesteuert hergestellt und immobilisiert. Die gespotteten Sequenzen ergaben pro Isoform drei Cellulosemembranen.

Die hergestellten Membranen (MM83/1-3 für Col IV α1 bzw. MM146/1-3 für Col IV α2) wurden dreimal 10 min mit je 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen, um die während der Herstellung verwendete Trifluoressigsäure zu entfernen. Anschließend wurden sie zweimal 10 min mit je 20 ml TBS-T gewaschen. Es wurde eine 8 μM Mip-Lösung in TBS-T hergestellt, und je 2 ml dieser Lösung wurden auf die Membranen gegeben, die danach in Durchsichthüllen eingeschweißt wurden. Durch das Einschweißen konnten kleinere Volumina für die Inkubation eingesetzt werden. Die Membranen wurden mit der Mip-Lösung über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen für 2 min in 20 ml Transferpuffer überführt. Das gebundene Mip wurde anschließend in einem semi-dry Blotverfahren auf Nitrocellulosemembranen transferiert (siehe III.7.2). Der Transfer unterschied

sich von der unter III.7.2 beschriebenen Vorgehensweise dadurch, dass in beide Richtungen geblottet wurde, da das Mip-Protein nicht denaturiert vorlag und der pH-Wert des Laufpuffers um den pI-Wert des Mip-Proteins lag. Also wurden beidseitig Membranen gelegt. Zudem wurde dasselbe Verfahren zweimal hintereinander durchgeführt. Beim ersten Mal wurde mit 400 mA für 30 min transferiert, um schwächer gebundenes Mip zu blotten. Danach wurde ein neuer Blot mit frischen Nitrocellulosemembranen aufgebaut und mit 400 mA für 90 min transferiert, um stärker gebundenes Mip zu transferieren. Somit hatte man am Ende für jede Peptid-Membran vier geblottete Membranen. Diese wurden wie unter III.7.2 beschrieben für Nachweis mittels Mip-spezifischer Antikörper weiterverarbeitet.

Die Cellulosemembranen konnten mehrfach verwendet werden, wenn sie regeneriert wurden. Dafür wurden sie der Reihe nach 10 min mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ , dreimal 10 min mit je 20 ml Stripping-Puffer A, dreimal 10 min mit je 20 ml Stripping-Puffer B und anschließend einmal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gewaschen. Die Membranen konnten in Frischhaltefolie eingewickelt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für längere Zeit aufbewahrt werden.

1x TBS-T-Puffer

50 mM Tris·Cl (pH 7,5)

150 mM NaCl

0,2 % (v/v) Tween 20 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Transferpuffer

25 mM Tris·Cl (pH 8,3)

150 mM Glycin

10 % (v/v) Methanol in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Stripping-Puffer A

8 M Harnstoff

1 % (w/v) SDS

0,1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Stripping-Puffer B

40 % (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

50 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

#### Mip-Stocklösung

16  $\mu$ M in 10 mM Hepes (pH 7,5)

### **7.4 Co-präzipitation von rekombinantem Mip mit biotinyliertem Peptid**

Je 100  $\mu$ l NeutrAvidin-Sepharose (Pierce, #29200) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, abzentrifugiert und einmal mit 500  $\mu$ l 1x PBS gewaschen (300 g, 2 min, RT) und in 100 ml 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurden je nach Ansatz 1  $\mu$ l biotinyliertes Peptid, 1  $\mu$ l DMF hinzugefügt, in einen Ansatz wurde nichts hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei RT für 30 min geschüttelt. Dann wurden die Suspensionen auf Handee™ Zentrifugiersäulchen (Pierce, #89868) gegeben und einmal mit 400  $\mu$ l 1x PBS gewaschen (300 g, 2 min, RT). Rekombinantes Mip wurde in 1x PBS auf 20 nM eingestellt. Die Sepharosekügelchen der einzelnen Ansätze wurden in je 200  $\mu$ l dieser Lösung resuspendiert und in den Säulchen ca. 7 min bei RT inkubiert, einmal zentrifugiert, erneut im Durchfluss resuspendiert und für weitere 7 min inkubiert. Nach der zweiten Inkubation wurde die Lösung abzentrifugiert und separat aufgefangen (Durchfluss). Die Sepharose der einzelnen Ansätze wurde dreimal mit je 500  $\mu$ l 1x PBS gewaschen und anschließend in je 100  $\mu$ l 1x PBS resuspendiert, mit ca. 30  $\mu$ l 4x Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 100 °C aufgeköcht und die Kügelchen erneut durch Zentrifugation entfernt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt (siehe III.7.1). Das in den einzelnen Fraktionen vorhandene Mip wurde anschließend mittels eines Western-Blots (siehe III.7.2) detektiert.

#### Peptidstocklösung

10 mM Stock in DMF

#### Mip-Stocklösung



38  $\mu\text{M}$  in 10 mM HEPES (pH 7,5 mit HCl)

### 7.5 HRP-Markierung von rekombinantem Mip

Die Markierung von Mip mit aktivierter Meerrettichperoxidase (HRP) erfolgte mit Hilfe eines Kits von AbD Serotec (#LNK001P). 100  $\mu\text{g}$  lyophilisierte HRP wurden in 400  $\mu\text{l}$  Mip Lösung (38  $\mu\text{M}$  in 10 mM Hepes, pH 7,5) aufgelöst, mit 40  $\mu\text{l}$  LYNX Modifizierungsreagenz versetzt und über Nacht bei RT auf einem Kipprollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die nicht reagierte HRP durch die Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  LYNX Quencherreagenz 2 h bei RT auf dem Kipprollenmischer inaktiviert. Das so hergestellte Mip-HRP-Konjugat wurde ohne weitere Aufreinigung für die folgenden Bindungsstudien verwendet. Für einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen wurde die Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

### 7.6 Collagen-Bindungsstudien mit HRP konjugiertem Mip

Für die Bindungsstudien wurden 10  $\mu\text{g}$  Collagen IV oder 5  $\mu\text{g}$  BSA in 50  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8,3) gelöst und jeweils in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte (Greiner, #655160) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundenes Protein wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit je 100  $\mu\text{l}$  1x PBS entfernt. Die Wells wurden mit je 50  $\mu\text{l}$  einer 3 %igen (w/v) BSA-Lösung (Fraktion V) in 1x PBS für 2 h bei 37 °C blockiert und anschließend einmal mit 1x PBS gewaschen. In jedes Well wurden je 50  $\mu\text{l}$  einer in 1x PBS + 1 % BSA 1:24 verdünnte Mip-HRP-Lösung gegeben. Dies entsprach in diesem Fall etwa 1,5  $\mu\text{M}$  bzw. 1,8  $\mu\text{g}$  Mip pro Well. Die Proteine wurden 4 h bei RT inkubiert. Ungebundenes Mip wurde durch dreimaliges Waschen mit je 100  $\mu\text{l}$  1x PBS entfernt, und die Platten wurden auf Zellstoff trockengeklopft. Anschließend wurden je 100  $\mu\text{l}$  Peroxidasesubstrat (Pierce, #34021) dazugegeben, 5 min bei RT inkubiert und die Farbreaktion durch die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt. Die Stärke der Reaktion wurde durch die Messung der Absorption bei 450 nm bestimmt. Als Hintergrund wurde der Mittelwert aus zwei Wells genommen, die nicht mit Proteinen beschichtet waren, aber dennoch mit BSA blockiert und mit Mip-HRP inkubiert wurden. Dieser Wert wurde von allen anderen abgezogen.

### 7.7 Protease-gekoppelte PPIase-Messung mit synthetisch hergestellten Peptiden 290/2 und 291/2

Die PPIase-Aktivität von Mip kann in einem Protease gekoppeltem Assay gemessen werden, in dem ein kleines Prolin-haltiges Peptid als Substrat verwendet wird. Dieses Substrat kann von  $\alpha$ -Chymotrypsin nur in seiner *trans*-Konformation gespalten werden kann. Es besitzt zudem C-terminal eine *p*-Nitroanilin-Gruppe (pNA), deren Absorption bei 390 nm nach der Abspaltung steigt, da es nicht mehr gequenchet wird [Fischer *et al.*, 1989]. Das Substrat liegt wegen des vorhandenen Prolins in einem Gleichgewicht aus seinen *cis*- und *trans*-Konformationen. Die Spaltung und somit die Zunahme der gemessenen Absorption ist abhängig von der Geschwindigkeit der Isomerisierung von *cis* in *trans*, die durch die Anwesenheit einer PPIase erhöht wird.

Da die Peptide nicht wasserlöslich sind, und eine eventuelle Oxidation der vorhandenen Cysteine durch DMSO vermieden werden sollte, wurde eine 20 mM Stocklösung in DMF hergestellt. Zudem wurde eine frische Chymotrypsin-Lösung (SigmaAldrich) im Messpuffer (35 mM HEPES pH 7,8) hergestellt (100 mg/ml). Das Mip Substrat (Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA) war in DMSO gelöst (100 mg/ml). Rekombinantes Mip lag ebenfalls im Messpuffer vor (38  $\mu$ M). Der Messansatz bestand aus folgenden Komponenten und war ständig auf 10 °C gekühlt:

- 1,6 ml Messpuffer
- 6  $\mu$ l Chymotrypsin (400  $\mu$ g/ml)
- 1  $\mu$ l Substrat (ca. 125  $\mu$ M)

Je nach Ansatz wurden 1  $\mu$ l Mip ( $\rightarrow$  25 nM Mip) ohne oder mit der entsprechenden Konzentration Peptid hinzugefügt. Es wurde immer mit Substrat gestartet ( $\rightarrow$  zuletzt das Substrat). Bei den Messungen ohne Mip wurde die Protease im Messpuffer für ca. 2 min gerührt und inkubiert, wonach erst das Substrat hinzugefügt und die Messung gestartet wurde. Bei Messungen mit Mip bzw. mit Mip und Peptiden wurden diese zuerst für 4 min im Messpuffer gerührt

und inkubiert, anschließend wurden Chymotrypsin und das Substrat unmittelbar nacheinander hinzugefügt und die Messung gestartet. Gemessen wurde die Zunahme an Absorption bei 390 nm über 360 sec mit Hilfe des Spektrophotometers Agilent 8453 mit der dazugehörigen UV-Visible ChemStation Software. Das Ergebnis wurde durch ein Makro im SigmaPlot (V.10) ausgewertet, die  $k_{\text{obs}}$ -Werte und der prozentuale Anteil des *cis*-konfigurierten Substrats wurden aufgeschrieben. Die Zugabe einer unter den Messbedingungen aktiven PPIase liefert die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$ . Anhand dieser Werte kann sowohl die Beschleunigung, als auch die Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion berechnet werden.

$$k_{\text{enz}} = k_{\text{obs}} - k_{\text{enz}}$$

$k_{\text{enz}}$  Geschwindigkeitskonstante der enzymatisch katalysierten Reaktion

$k_{\text{obs}}$  beobachtete Geschwindigkeitskonstante

$k_{\text{enz}}$  Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{enz}}$  ist von der verwendeten PPIase und deren Konzentration im Messansatz abhängig. Das Maß für die spezifische Aktivität einer PPIase gegenüber einem Substratpeptid ist der Quotient  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ . Dieser errechnet sich aus dem Quotienten von  $k_{\text{enz}}$  und der Enzymkonzentration im Messansatz.

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{M}}} = \frac{K_{\text{enz}}}{[E]}$$

$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  Spezifitätskonstante eines Enzyms gegenüber einem Substrat

$K_{\text{enz}}$  Geschwindigkeit der enzymatisch katalysierten Reaktion

$[E]$  Enzymkonzentration im Messansatz

Um einen möglichen Einfluss von DMF auf die enzymatische Aktivität von Mip auszuschließen wurden auch Messungen mit Mip und mit 0,5 % bzw. 0,1 % DMF durchgeführt. Während bei 0,5 % DMF der  $k_{\text{obs}}$ -Wert um ca. 30 % abnahm, war der  $k_{\text{obs}}$ -Wert bei 0,1 % DMF vergleichbar zu Messungen mit nur 25 nM Mip. Daher wurde in den Messungen darauf geachtet, nicht mehr als 0,1 % DMF im Messansatz zu haben. Um einen Einfluss des Peptids 290/2 auf Chymotrypsin auszuschließen, wurden die Messungen auch ohne Mip aber mit 20  $\mu\text{M}$  290/2 durchgeführt. Es konnte kein Effekt des Peptids auf die proteolytische Aktivität des Chymotrypsins beobachtet werden.

## IV ERGEBNISSE

### 1. Molekulare Interaktion zwischen Mip und humanem Collagen IV

#### 1.1 Identifizierung einer Mip-Bindungssequenz in Collagen IV

Mip ist in der Lage an die extrazelluläre Matrix (ECM) zu binden. Unter den unterschiedlichen Komponenten der ECM bindet rekombinantes Mip am besten an Collagene und darunter am besten an Collagen IV [Wagner *et al.*, 2007]. Collagene sind Strukturproteine der ECM, die gewebespezifisch unterschiedlich häufig vorkommen. Collagen IV ist das Hauptcollagen der Lungenepithelien und besteht aus zwei  $\alpha 1$ -Molekülen und einem  $\alpha 2$ -Molekül (Isoformen), die eine Trippelhelix bilden. Die nachgewiesene Affinität von Mip zu Collagen IV legte die Suche nach einer spezifischen Mip-Bindungssequenz in Collagen IV nahe. Dafür wurde der Ansatz eines Peptidarrays verfolgt. Die Primärsequenzen der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Isoformen wurden in einzelne 13-mer Peptide unterteilt, wobei jedes Peptid mit dem vorherigen Peptid um 10 Aminosäuren überlappte. Die auf diese Weise definierten Peptide wurden mit Hilfe der SPOT<sup>TM</sup>-Methode auf Cellulosemembranen hergestellt und immobilisiert. Die Primärsequenzen wurden aus der NCBI-Datenbank erhalten (s. Anhang). Die Membranen wurden wie unter III.7.3 beschrieben mit rekombinantem Mip inkubiert und das gebundene Mip wurde anschließend mit Hilfe eines Western-Blots nachgewiesen. Allgemein kann gesagt werden, dass die meisten Treffer mit dem Array erzielt wurden, auf dem die Aminosäuresequenz der  $\alpha 1$ -Isoform gespottet war. Im Falle der  $\alpha 1$ -Isoform waren die meisten Treffer im C-terminalen Ende, im Falle der  $\alpha 2$ -Isoform im N-terminalen Ende lokalisiert. Es wurden sowohl einzelne Spots als auch Reihen von Spots mit zu- und abnehmender Signalintensität beobachtet. Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 8 aufgelistet. Im Falle von Spotreihen wurde eine qualitative Beurteilung der Signalintensität durchgeführt. Der Spot mit dem qualitativ stärksten Signal ist zusätzlich in der Tabelle wiedergegeben. Es wurden jedoch auch Signale von Spots erhalten, die von keinem Peptid besetzt waren. Solche leere Spots entstehen während der

computergesteuerten Herstellung der Membran und sind mit „???“ annotiert. Signale aus solchen Spots wurden als falsch positiv bewertet.

**Tab. 8: Übersicht der Spots und den entsprechenden Peptiden aus, die als mögliche Mip-Bindungssequenzen identifiziert wurden.**

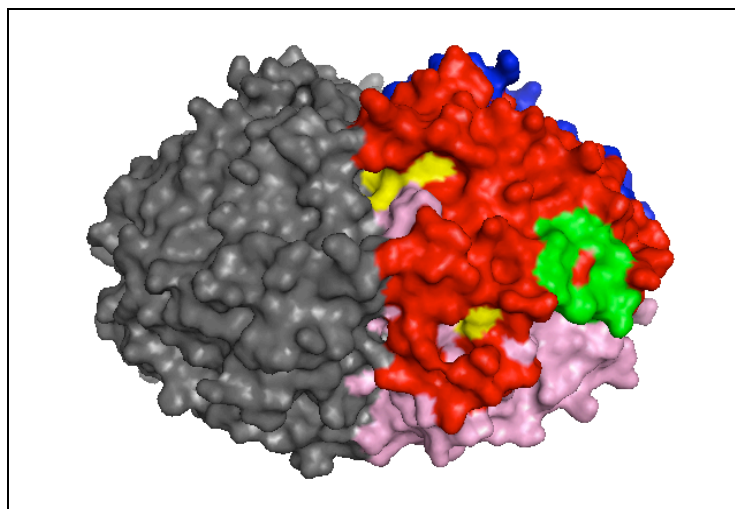
	Spot #	Erstes Peptid	Peptid mit stärkstem Signal	Letztes Peptid
MM83/1 (o)	145-148	ECQPGPZGDQGPZ	PGPZGDQGPZGIZ	QGPZGIZGQZGFI
	170-173	VAGVZGPQGTZGL	VZGPQGTZGLIGQ PQGTZGLIGQZGA	TZGLIGQZGAKGE
	276-278	LGGKILDMEPPGG	LGGKILDMEPPGG VGPHMEDGKIGL	MGLIGDGEPPHGV
	296-297	SZKELGGGGPQZM	n.d.	GZMQQGGGFELKS
MM83/1 (u)	101-102	ZGFZGEZGYZGLI	n.d.	ZGEZGYZGLIGRQ
	147-148	ZGDQGPZGIZGQZ	n.d.	QGPZGIZGQZGFI
	172-173	PQGTZGLIGQZGA	n.d.	TZGLIGQZGAKGE
MM83/3 (o)	99-102	SRNDYSYWLSTPE	DYSYWLSTPEPMP	STPEPMPMSMAPI
	116-120	QIPPCPSGWSSLW	PCPSGWSSLWIGY	WIGYSFVMHTSAG
	131-136	APFIECHGRGTCN	IECHGRGTCNYA NYANAYSFWLAT	ANAYSFWLATIER
	152-155	???		???
	254	LIPCIDSQKDGPT		
	299-306	GGQGPAASSELGA	LGALCSSASGPQP NAHCCPGETFRIG	NAHCCPGETFRIG
	352-357	???		???
	361-363	???		???
	225	KZQLPGGGGLLKZ		
	250	IDTVTHRLQGHFS		
	275	PDSLMYTWPSPYE		
	300	LGALCSSASGPQP		
	325	???		
MM83/3 (u)	97-98	NVCNFASRNDYSY	NVCNFASRNDYSY	NFASRNDYSYWLS
	122-123	VMHTSAGAEGSGQ	n.d.	TSAGAEGSGQALA
	77	TRHSQTIDDPQCP		
	102	STPEPMPMSMAPI		
	127	ASPGSCLEEFRSA		

MM146/1 (o)	9-10	MGPVGAZGRZGPZ	n.d.	VGAZGRZGPZGPZ
	13-15	ZGPZGPKGQQGNR	ZGPKGQQGNRGLG	KGQQGNRGLGFYG
	60-63	GARGDZGFZGAQG	n.d.	GAQGEZGSQGEZG
	133	RDGLDGFZGLZGP		
	222	???		
	226-228	QRZEFGGGGELZV	QRZEFGGGGELZV	ZZQFRGGGGLPVZ
	301	LPDGAKPIZGGFI		
MM146/1 (u)	26	LHPHAPTGVTFH		

Es wurden mit Hilfe des Peptidarrays sowohl einzelne Spots als auch Spotreihen ermittelt, die als mögliche Bindungssequenzen in Frage kommen. Im Falle von Spotreihen sind die Sequenzen des ersten und des letzten Peptids sowie des mit dem qualitativ stärksten Signal aufgelistet. In manchen Fällen hatten zwei Spots einer Reihe dieselbe Intensität, oder wie häufig in Spotpaaren, konnte keinem der Spots ein stärkeres Signal zugeordnet werden (n.d.). Da wie in III.7.3 beschrieben in zwei Richtungen geblottet wurde, wurden die erhaltenen Western-Blots getrennt ausgewertet und mit u (unten, Anode) oder o (oben, Katode) vermerkt. Auch als falsch positiv anzusehende Spots, auf denen keine Peptide gespottet waren, sind in der Tabelle aufgeführt (???).

Da die meisten Treffer aus den Peptidarrays im C-terminalen Ende des Collagen IV  $\alpha 1$ -Moleküls lokalisiert waren, wurden diese genauer untersucht. Dieser Bereich der Collagene bildet im Gegensatz zum trippelhelicalen Hauptteil des Collagens eine globuläre nicht-collagenöse Struktur und wird daher auch NC1-Domäne genannt (Abb. 7) [Khosnoodi *et al.*, 2006]. Wegen der globulären Struktur würde *in vivo* nicht jedes detektierte Peptid für Mip zugänglich sein. Daher war es von Interesse, die Lage der Treffer in der nativen NC1-Domäne zu identifizieren. Für die Analyse wurden die Peptidtreffer mit den stärksten Signalen und eine bereits bekannte Kristallstruktur der NC1-Domäne aus der Proteindatenbank verwendet (pdb-Nr:1LI1). Nach der Lokalisation innerhalb der Struktur, wurde die Anzahl der an der Oberfläche vorliegenden Aminosäuren durch die Gesamtlänge des Peptids geteilt und somit der Oberflächenanteil jedes

Peptids prozentual berechnet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 9 aufgeführt.



**Abb. 7: Räumliche Lokalisation einzelner Peptide in der NC1-Domäne.** Die publizierte Kristallstruktur (pdb-Nr. 1LI1) wurde für die Analyse der räumlichen Lokalisation der möglichen Mip-Bindungssequenzen in der NC1 Domäne des Collagen IV  $\alpha 1$  verwendet (Tab. 8). Die Struktur gibt ein Hexamer wider, das aus zwei Trimeren besteht. Der linke Trimer ist einheitlich grau gefärbt. Im rechten Trimer ist jedes Monomer einzeln gefärbt (rot und blau je eine  $\alpha 1$ -Isoform, pink eine  $\alpha 2$ -Isoform). Als Beispiel sind in der rot markierten  $\alpha 1$ -Isoform das Peptid 290 mit 100 %iger Exposition (grün) und das Peptid von Spot 135 mit 5 %iger Exposition (gelb) hervorgehoben (s.a. Tab. 8).

**Tab. 9: Lokalisation der Treffer aus der NC1-Domäne von Collagen IV  $\alpha 1$ .**

Spot #	Peptidsequenz	Start	Ende	Anteil an NC1-Oberfläche
116 ( <b>P290</b> )	IPPCPSGWSSLWI	1517	1529	100%
117	PCPSGWSSLWIGY	1519	1531	90%
102	STPEPMPMSMAPI	1474	1486	80%
77 ( <b>P291</b> )	TRHSQTIDDPQCP	1399	1411	50%
127	ASPGSCLEEFRSA	1549	1561	50%
100	DYSYWLSTPEPMP	1468	1480	25%
132	IECHGRGTCNYA	1564	1576	10%
135	NYYANAYSFWLAT	1573	1585	5%
97	NVCNFASRNDYSY	1459	1471	5%
98	NFASRNDYSYWLS	1462	1474	5%
123	TSAGAEGSGQALA	1537	1549	1%
122	VMHTSAGAEGSGQ	1534	1546	0%

Die Treffer mit dem jeweils stärksten Signal aus der NC1-Domäne von Collagen IV  $\alpha 1$  wurden anhand bekannter Strukturen (pdb-Nr:1LI1) auf Ihre Lage im nativen Protein untersucht. Der Anteil, der auf der Oberfläche des Proteins liegt und somit zugänglich für Mip ist, wurde in Prozent ausgerechnet. Zusätzlich sind die dazugehörige Spotnummer auf MM83/3 sowie Position in Collagen IV  $\alpha 1$

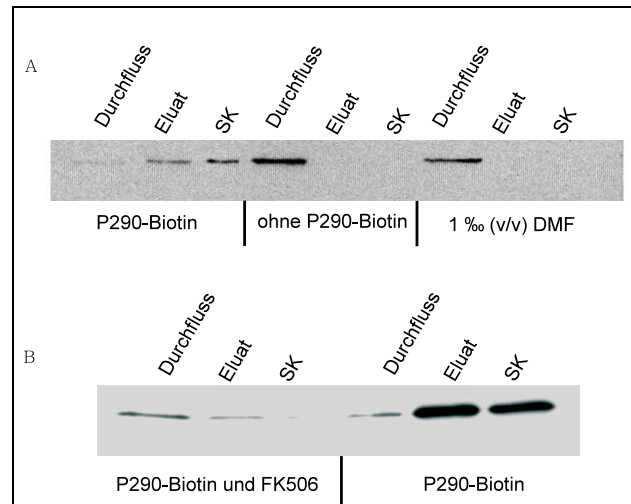


angegeben. Zwei der Peptide wurden chemisch synthetisiert und P290 bzw. P291 genannt.

Wie in Tabelle 9 aufgeführt, liegt von den Treffern nur das Peptid auf Spot 116 zu 100 % auf der Oberfläche der NC1-Domäne. Ein weiteres Peptid, das zu 90 % exponiert ist, entspricht dem Spot 117, dem Folgepeptid von Spot 116. Weitere neun Peptide waren zu 50 % oder weniger exponiert, und somit *in vivo* schwer zugänglich für das Mip Protein (Abb. 7). Von diesen Peptiden wurden zwei, nämlich P290 (Spot 116) und P291 (Spot 77) chemisch synthetisiert, um in weiteren Assays getestet zu werden.

## **1.2 Nachweis der Bindung zwischen Mip und P290 durch Co-präzipitation**

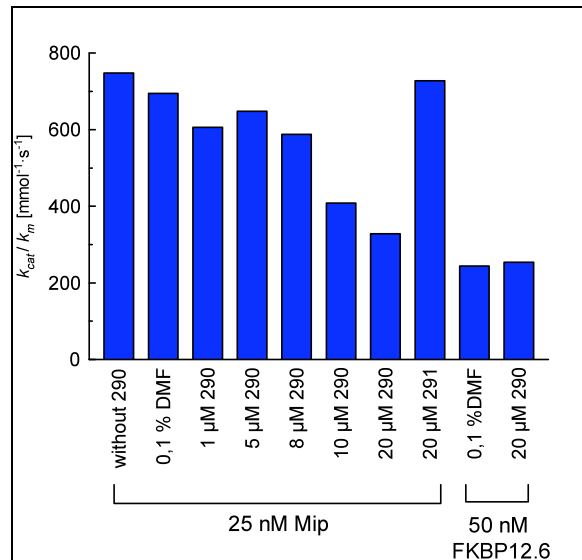
Um die Bindung von P290 an Mip nachzuweisen, wurden biotinyliertes P290 an Neutravidin-Sepharose (siehe III.7.4) immobilisiert und anschließend mit 20 nM rekombinantem Mip in Ab- oder Anwesenheit von 100  $\mu$ M FK506 inkubiert. Das ungebundene Mip wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt. Dann wurde das gebundene Mip mit Hilfe des Probenpuffers eluiert. Der Durchfluss, das Eluat und das gesammte Sepharose-Material wurden in einem 12 %igen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und das Mip mit Hilfe eines Western-Blots nachgewiesen. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass Mip nur in Anwesenheit von P290 an die Sepharose bindet. In Abwesenheit von P290 konnte nur in der Durchflussfraktion Mip nachgewiesen werden (Abb 8A). Wenn das Mip vor der Co-inkubation mit P290-gesättigter Sepharose mit dem PPIase-Inhibitor FK506 behandelt wurde, wurde ebenfalls der Großteil des aufgefangenen Mips in der Durchflussfraktion nachgewiesen (Abb 8B). Diese Ergebnisse zeigen, dass P290 in der Lage ist, eine stabile Wechselwirkung mit Mip einzugehen. Zudem muss diese Wechselwirkung z.T. über die PPIase-Domäne des Mip-Proteins vermittelt werden, da die Präinkubation mit dem PPIase-spezifischen Inhibitor FK506 zu einer deutlichen Anreicherung des Mips in der Durchflussfraktion führte.



**Abb. 8: Co-präzipitation von Mip mit P290-Biotin.** (A) Biotinyliertes P290 wurde auf Neutravidin-Sepharose immobilisiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 20 nM Mip inkubiert. Das ungebundene Protein wurde in der Durchflussfraktion aufgefangen. Nach mehrmaligem Waschen wurde das gebundene Mip mit Probenpuffer eluiert. Das Mip in den einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe eines Westernblots nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde Mip derselbe Ansatz ohne P290-Biotin sowie mit 1 % (v/v) DMF aber ohne P290-Biotin durchgeführt. Das Ergebnis ist ein repräsentatives von zwei Experimenten. (B) Durch die Präinkubation mit FK506 kann die Menge an Mip, die eluiert werden kann, deutlich reduziert werden.

### 1.3 Messung der inhibitorischen Aktivität von P290 auf die PPIase-Aktivität von Mip

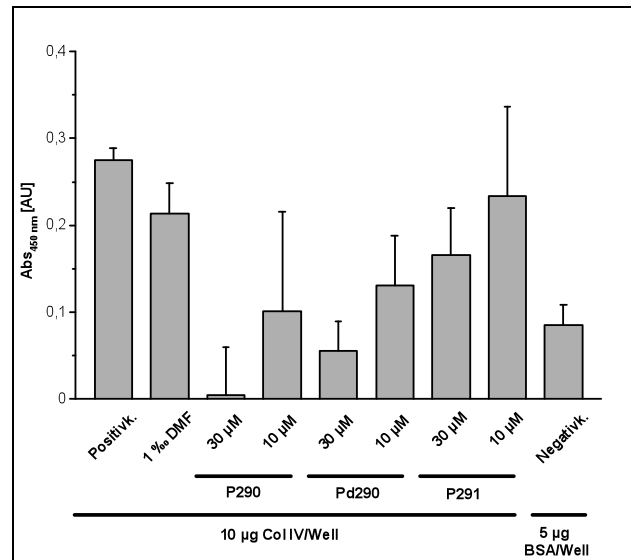
In Anbetracht der vorherigen Ergebnisse und der Annahme, dass P290 eine putative Mip-spezifische Bindungssequenz in Collagen IV  $\alpha 1$  darstellt und diese Bindung über die PPIase-Domäne des Mip-Proteins zustande kommt, wurde P290 in einem Protease-gekoppeltem PPIase-Assay getestet (III.7.5). Die PPIase-Aktivität von Mip wurde in An- und Abwesenheit der Peptide P290 und gemessen. Hierbei konnte bei P290 eine konzentrationsabhängige Inhibition der PPIase-Aktivität beobachtet werden, die bei 20  $\mu\text{M}$  am größten war. Im Gegensatz dazu hatten 20  $\mu\text{M}$  P291 keinen Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Mip. Zusätzlich zu Mip wurde auch FKBP12, eine humane PPIase, mit 20  $\mu\text{M}$  P290 behandelt. In diesem Fall konnte kein Unterschied zur Negativkontrolle ohne P290 beobachtet werden (Abb. 9).



**Abb. 9: PPIase-Assay mit P290 und P291.** Die Zugabe von P290 inhibiert die PPIase-Aktivität von Mip in einer konzentrationsabhängigen Weise. Während 20 µM P290 die Aktivität auf die Hälfte reduziert, haben 20 µM P291 keinen vergleichbaren Effekt. 20 µM P290 haben auf die nächstverwandte humane PPIase, FKBP12.6, keine vergleichbare Wirkung. Es wurde eine 1 % (v/v) DMF-Kontrolle gemacht, da die Peptide in DMF gelöst waren, und die Endkonzentration von DMF in der Reaktion stets 1 % (v/v) betrug. Die Graphen geben Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils Doppelbestimmungen.

#### 1.4 Inhibition der Bindung von Mip an Collagen IV durch P290

Da P290 eine mögliche Mip-Bindungssequenz innerhalb des Collagen IV-Moleküls darstellt, wurde der Einfluss von P290 auf die Bindungsfähigkeit an Collagen IV von Mip in einem ELISA getestet. Dafür wurden 10 µg Collagen IV in den Näpfen einer 96-Well-Platte immobilisiert und anschließend mit HRP-gekoppeltem rekombinantem Mip in An- oder Abwesenheit von P290, P291 sowie Pd290 inkubiert. dP290 ist ebenfalls ein synthetisch hergestelltes Peptid, das von der Sequenz her mit P290 zu 100 % identisch ist, für dessen Synthese jedoch ausschließlich D-Aminosäuren verwendet wurden. Die Zugabe von 30 µM P290 zu Mip verursachte eine drastische Abnahme der Collagen-Bindung von Mip-HRP, während dieser Effekt bei 10 µM P290 viel geringer ausfiel. Ebenso konnten die Peptide Pd290 und P291 die Bindung von Mip an Collagen IV deutlich schlechter unterbinden (Abb. 10). Dieses Ergebnis zeigt somit, dass P290 eine spezifische Collagen-Bindungssequenz für Mip darstellt und, dass das Mip Protein eine stärkere Affinität gegenüber L-Aminosäuren besitzt.

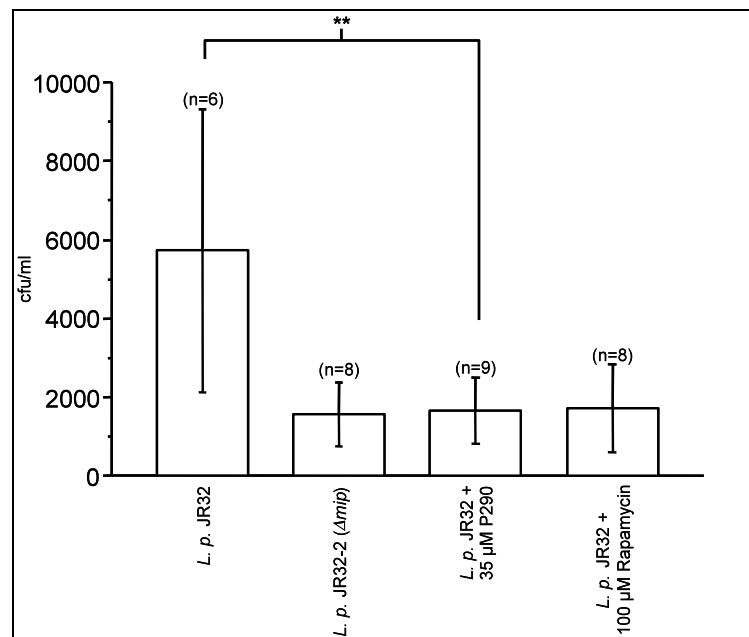


**Abb. 10: Collagen-Bindungsassay mit HRP-markiertem rekombinatem Mip.** Die Näpfe von 96-Well-Zellkulturplatten wurden mit je 10 µg Collagen IV oder 5 µg BSA (Fraktion V) beschichtet und anschließend in An- oder Abwesenheit der Peptide P290, dP290 und P291 mit HRP-markiertem Mip inkubiert. Nach dem Abwaschen des ungebundenen Mips wurde die Bindung mit Hilfe der Peroxidase-Reaktion photometrisch ermittelt und die Absorption bei 450 nm bestimmt. 30 µM P290 können die Bindung von Pmip an Collagen IV deutlich unterbinden, während bei 10 µM dieser Effekt verschwindet. 30 µM Pd290 können die Bindung nicht so deutlich unterbinden wie P290. Der schwächste Effekt wurde mit P291 beobachtet. Die Graphen geben die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei getrennten Versuchen mit je doppeltem Ansatz wieder.

## 1.5 Auswirkungen von P290 auf die bakterielle Transmigration

Es ist bereits bekannt, dass Mip während der Transmigration von Bakterien über eine intakte Epithelbarriere eine Rolle spielt. Die Identifizierung von P290 als eine mögliche Bindungssequenz in Collagen IV, dem wichtigsten Strukturprotein der extrazellulären Matrix in der Lunge, und der Nachweis dessen inhibitorischen Potentials im PPIase-Assay sowie in Bindungsstudien legte die Frage nahe, ob P290 auch eine Auswirkung während der bakteriellen Transmigration in einem *in vitro* System haben kann. Dafür wurde NCI H292-Zellen in Transwell-Einsätzen zu einem konfluenten Zellrasen gezüchtet. Anschließend wurden  $10^7$  Bakterien auf die Zellen gegeben und nach fünf Stunden Co-inkubation die Anzahl der Bakterien bestimmt, die in der Lage waren diese Barriere zu überwinden und in den Zellkulturnapf zu gelangen (III.4.4). Für diesen Assay wurden der wildtypische Bakterienstamm *L. pneumophila* JR32 und dessen  $\Delta mip$ -Mutante verwendet. Zusätzlich wurde *L. p.*

JR32 mit 35  $\mu\text{M}$  P290 oder 100  $\mu\text{M}$  Rapamycin 20 min präinkubiert. Rapamycin diente hier als Positivkontrolle, da es ein bekannter Inhibitor von Mip ist, der auch die bakterielle Transmigration unterbindet. Diese Versuche zeigten, dass 35  $\mu\text{M}$  P290 in der Tat in der Lage waren, die bakterielle Transmigration in einer statistisch signifikanten Weise ( $p \leq 0,01$ ) auf ein Niveau der  $\Delta mip$ -Mutante zu reduzieren (Abb. 11).



**Abb. 11: Transwell-Versuche mit P290.** Je  $10^7$  Bakterien wurden auf konfluente, in einem Transwelleinsatz gezüchtete Zellen gegeben. Nach 5 Stunden wurde die Zahl der Bakterien, die die Zellbarriere überwinden konnten, durch Ausplattieren bestimmt. Die Zugabe von 35  $\mu\text{M}$  P290 reduziert deutlich die Zahl der Bakterien, die die Barriere passieren können ( $p \leq 0,01$ ), sodass Werte wie bei der  $\Delta mip$ -Mutante (L.p. JR32-2) oder dem mit 100  $\mu\text{M}$  Rapamycin behandeltem Wildtyp L.p. JR32 erzielt werden konnten. Die Graphen geben die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen wieder. Die Gesamtzahl der ausgewerteten Ansätze (n) ist in Klammern angegeben.

## 1.6 Untersuchungen zur Struktur des Mip-P290-Komplexes in Lösung mit Hilfe von NMR

Die Nuclear Magnet Resonance (NMR)-Technologie ermöglicht die Untersuchung von Proteinstrukturen in wässrigen Lösungen. Mit Hilfe der NMR wurden bereits die Struktur der PPlase-Domäne des  $^{15}\text{N}$ -markierten rekombinanten Mip-Proteins und auch die Struktur des Komplexes aus Mip und



Aminosäuren mit einem starken Signal sind grün, die mit einem schwachen Signal orange gefärbt.

## 1.7 Zusammenfassung

Mit Hilfe eines Peptidarrays, auf dem 13 Aminosäuren lange und je über 10 Aminosäuren überlappende Peptide der Collagen IV  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Moleküle gespottet waren, konnte eine Mip-Bindungssequenz (P290) identifiziert werden. Die Spezifität der Bindung wurde durch Kopräzipitationsexperimente und kompetitive Bindungsassay mit rekombinantem Mip und chemisch synthetisiertem P290 bestätigt. Zudem konnte in Protease-gekoppelten Assays eine inhibitorische Aktivität von P290 auf die PPIase-Aktivität von Mip gemessen werden. P290 war zudem in der Lage *in vitro* die bakterielle Transmigration über eine Epithelzellbarriere zu verringern. Die Bindung zwischen Mip und P290 wurde zusätzlich mit Hilfe von NMR-Messungen analysiert. Diese bestätigten die Bindung des Peptids in die PPIase-Domäne von Mip und die Interaktion der Aminosäuren dieser Domäne mit dem gesamten Peptid.

## 2. *Dictyostelium discoideum* als Wirtsmodellorganismus

### 2.1 Identifikation von Wirtsfaktoren mit Hilfe von *knock out* – Mutanten

Obwohl in den letzten Jahren viele Virulenzfaktoren von *L. pneumophila* identifiziert wurden, sind in vielen Fällen deren Wirkungsweise bzw. ihre möglichen Ziele in den Wirtszellen größtenteils unbekannt. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit der Ansatz verfolgt, gezielt Deletionsmutanten von *D. discoideum* zu untersuchen. Dafür wurden Wirtsfaktoren ausgesucht, die auch im Menschen mit einer hohen Homologie vorkamen, mit menschlichen Krankheiten assoziiert waren oder an wichtigen zellulären Prozessen wie der Dynamik des Aktinzytoskeletts, dem endolysosomalen Transport oder der Phosphoinositol-Kaskade beteiligt sind.

Die ausgesuchten Mutanten und der jeweilige Wildtypstamm wurden mit *L. pneumophila* Corby wie unter III.4.1 beschrieben infiziert. In jeder Infektion wurde die Aufnahme der Bakterien nach drei Stunden sowie die Vermehrung der Bakterien über eine Zeitspanne von 96 h in der Mutante und im Wildtyp verglichen.

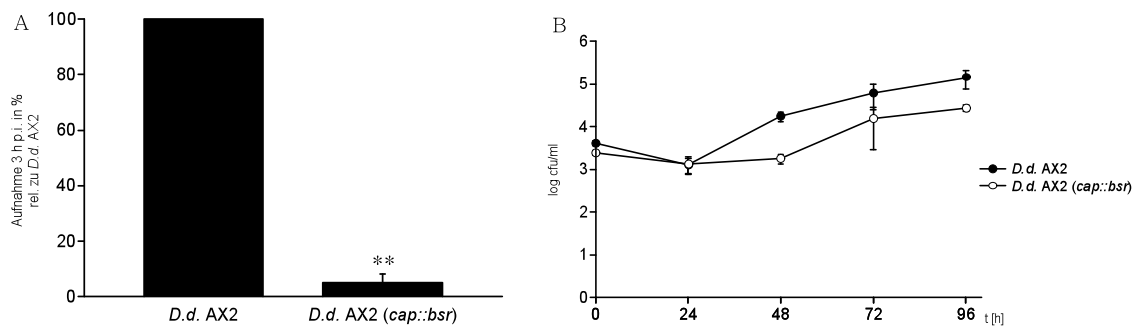
#### 2.1.1 Mutanten des Aktinzytoskeletts

##### – Cyclase-assoziiertes Protein (CAP)

Das Cyclase-assoziierte Protein (CAP) bindet an die Adenylatcyclase A (ACA) von *D. discoideum* und an F-Aktin. Durch die Bindung an F-Aktin wird die Depolymerisierung in G-Aktin verursacht. Die Wechselwirkung mit ACA führt zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Dies wiederum hat unter anderem zur Folge, dass der intrazelluläre Vesikeltransport gestört wird [Sultana *et al.*, 2005]. CAP wird als ein essentielles Protein betrachtet, da eine vollkommene Deletion des Gens erfolglos war. Es konnte lediglich eine Mutante erzeugt werden, in der die Expression des Gens im Vergleich zum Wildtyp um 95 % reduziert ist.



In einer Infektion mit *Legionella pneumophila* Corby konnte eine um 95 % schlechtere Aufnahme der Bakterien durch die Mutante beobachtet werden (Abb. 13A). Die Vermehrung der Bakterien fiel über 96 h 10-fach geringer aus. Dies ist jedoch auf die schlechte Aufnahme der Bakterien zurückzuführen (Abb. 13B).



**Abb. 13: Invasions- und Infektionsstudien der *cap::bsr*-Mutante.** (A) Die Aufnahme von *Legionella pneumophila* ist in der *cap::bsr*-Mutante um ca 95 % schlechter als im Wildtyp AX2 ( $p \leq 0,01$ ). (B) Die Vermehrung von *L. pneumophila* in der *cap::bsr*-Mutante ist vergleichbar mit der im Wildtyp AX2. Die anfängliche Verzögerung ist auf die schlechte Aufnahme der Bakterien zurückzuführen. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

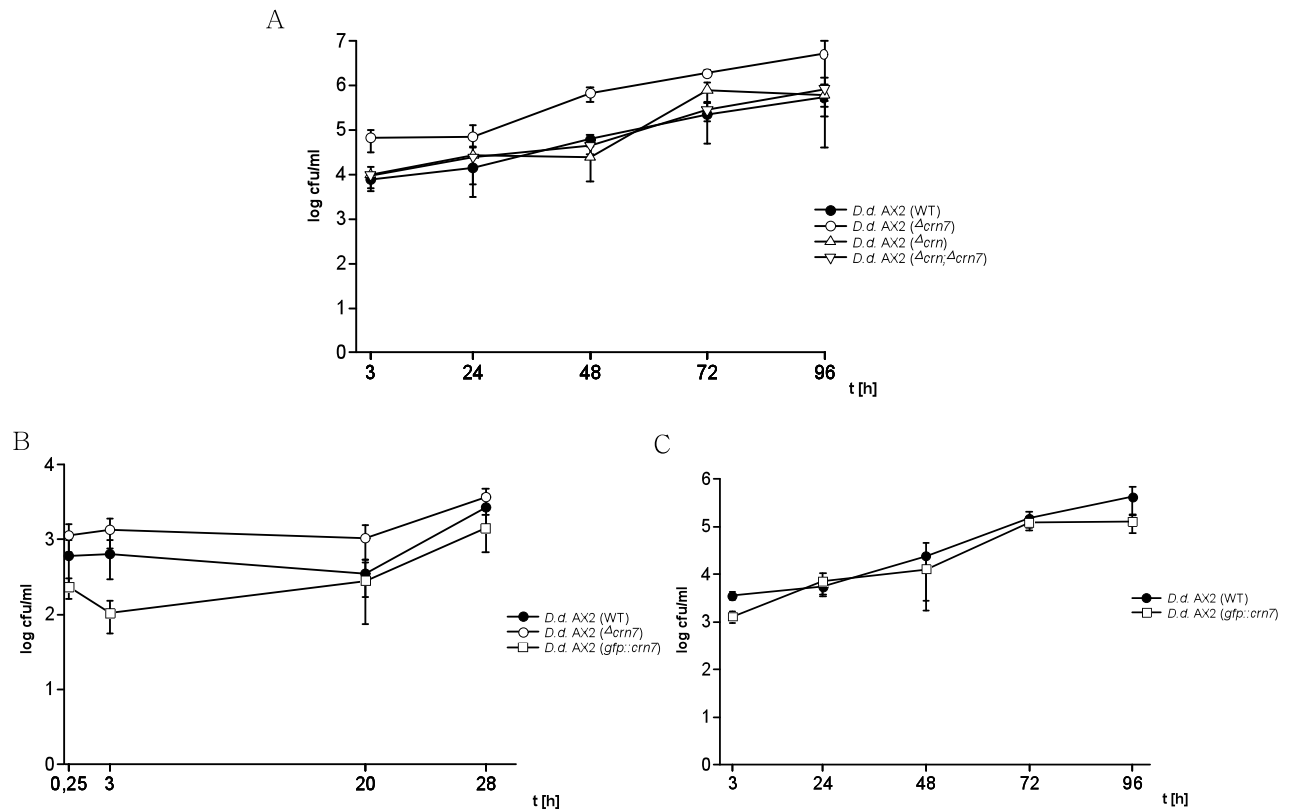
## - Coronin 7

Coronine sind Aktin-bindende Proteine, die zuerst in *D. discoideum* beschrieben wurden [de Hostos *et al.*, 1991]. Coronine zeichnen sich durch das Vorhandensein von WD40-Motifen aus. Dies sind ca. 40 Aminosäuren lange repetitive Sequenzen, die mit einer Tryptophan(W)-Aspartat(D)-Abfolge enden. Mehrere dieser Motive sind in der Lage, globuläre  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu bilden, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Während Säugetiere sieben unterschiedliche Coronine besitzen, sind in *Dictyostelium* Coronin 1 und Coronin 7 bekannt. Coronin 7 ist womöglich durch Genduplikation entstanden, da es zwei hintereinander liegende Coronin-Domänen aufweist [Rybakin *et al.*, 2004, Shina und Noegel, 2008].

Das meist untersuchte Coronin 1 akkumuliert an den Pseudopodien und am Phagozytosebecher von *D. discoideum*, und eine Deletion beeinträchtigt die Kriechgeschwindigkeit sowie die Endozytoserate der Zellen. Die Isoform Coronin 1A ist in Säugetierzellen an der intrazellulären Lokalisation von

diversen Proteinen, wie z.B. einer Phospholipase oder der p40<sup>phox</sup>-Untereinheit der NADPH-Oxidase, beteiligt [Suzuki *et al.*, 1995, Grogan *et al.*, 1997]. Die genauen Wechselwirkungen mit dem Aktinzytoskelett und weiteren Proteinen sind jedoch weitestgehend unklar. Für Coronin 7 ist zusätzlich zur Zellmembran eine Assoziation mit Membranen des Golgi-Apparates beschrieben [Rybakin *et al.*, 2008].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer Deletion des Coronin 7-Gens auf die *Legionella*-Infektion untersucht. Zusätzlich zu der Coronin 7-Mutante standen auch eine Coronin 1 sowie eine Coronin 1 und 7-Doppelmutante zur Verfügung, und wurden vergleichend eingesetzt. Wenn *D. discoideum* AX2 und die einzelnen Coronin-Deletionsmutanten mit *L. pneumophila* Corby infiziert wurden, konnte im Falle der *crn7*-Deletion eine ca. 8-fache Zunahme in der Aufnahme der Bakterien beobachtet werden, während die bakterielle Aufnahme im Falle der  $\Delta crn1$  bzw. der  $\Delta crn1/\Delta crn7$ -Mutanten vergleichbar mit dem Wildtyp war (Abb 14A). Der Verlauf der Infektionen war jedoch in allen Stämmen von ihrer Kinetik her vergleichbar. Übereinstimmend mit der Beobachtung in der *crn7*-deffizienten Mutante, konnten aus einem GFP-Crn7 überexprimierenden Stamm in 3 h nach Infektionsbeginn weniger Bakterien isoliert und somit der Phänotyp der Deletion revertiert werden (Abb. 14C). Um auszuschließen, dass die hohe Zahl an isolierten Bakterien eigentlich auf eine bessere Aufnahme zurückzuschließen ist und nicht darauf, dass die aufgenommenen Bakterien in der  $\Delta crn7$ -Mutante schlechter abgebaut werden, wurde die initiale Inkubationszeit vor der Gentamicinbehandlung von 3 h auf 15 min reduziert. Nach dieser kurzen Zeit wurde mit der Gentamicinbehandlung fortgefahren wie unter III.4.1 beschrieben. Zusätzlich wurden die frühen Zeitpunkte 3, 20 und 28 h untersucht. Dieser Ansatz zeigte, dass bereits in den ersten 15 min der Infektion der zuvor zwischen Wildtyp und der *crn7*-Deletionsmutante beobachtete Unterschied in der Aufnahme auftauchte, und dass die Überexpression von *crn7* den Effekt revertierte. Der Infektionsverlauf zeigte in den darauffolgenden 28 h keinen Unterschied zwischen Wildtyp und der Deletionsmutante, während im überexprimierenden Stamm eine frühe Abnahme der Zellzahl beobachtet werden konnte (Abb 14B).

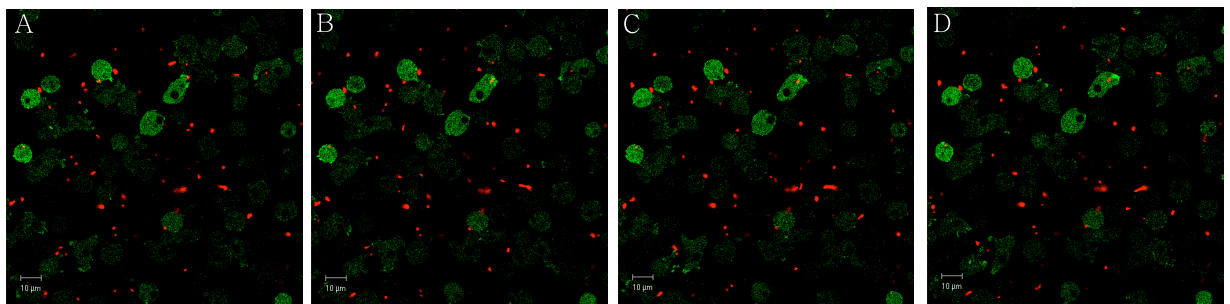


**Abb. 14: Infektionsstudien mit unterschiedlichen Coronin-Mutanten.**

(A) Infektion von *D. d. AX2* und dessen *crn1*<sup>-</sup>, *crn7*<sup>-</sup> und *crn1/crn7*-Mutanten mit *L. pneumophila* zeigte, dass die Aufnahme der Bakterien in allen Stämmen bis auf die  $\Delta crn7$ -Mutante vergleichbar ist. In der  $\Delta crn7$ -Mutante ist die Aufnahme hingegen ca. 8-fach besser als in den anderen Stämmen. Der Verlauf der Infektionen über 96 h ist in allen Stämmen vergleichbar. (B) Die hohe Bakterienzahl zu 3 h pi in der *crn7*-Deletionsmutante ist auf die Aufnahme der Bakterien zurückzuführen, da der Effekt von (A) auch in sehr frühen Phasen der Infektion zu beobachten ist. (C) Die Überexpression von Crn7 als ein GFP-Fusionsprotein führt zur kompletten Reversion des Phänotyps der *crn7*-Deletion, wie man es an der Zahl der zu 3 h pi isolierten Bakterien erkennen kann. Der Verlauf der Infektion ist dem Wildtyp vergleichbar. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei getrennten Infektionen mit doppeltem Ansatz.

Die Infektionsversuche zeigten, dass Crn7 auf eine unbekannte Weise die Aufnahme von *L. pneumophila* beeinflusste. Da das Fehlen von Crn7 die Aufnahmerate um ein Achtfaches steigerte, konnte auf einen negativen Einfluss von Crn7 während der Aufnahme der Legionellen geschlossen werden. Da ein GFP-Crn7 überexprimierender Stamm zur Verfügung stand, wurde Lebendmikroskopie durchgeführt, um eine mögliche Co-lokalisierung von Crn7 und aufgenommenen Bakterien zu beobachten. Dafür wurden Wildtyp-Bakterien wie unter III.5.2 beschrieben mit Rhodamin markiert und in Chamberslides zu den Dictyostelien hinzugefügt. Anschließend wurden die Infektionen mit einem konfokalen Lasermikroskop beobachtet und mögliche Aufnahmeereignisse

dokumentiert. Es konnte nur in sehr seltenen Fällen eine Aufnahme beobachtet werden, was mit den Infektionen übereinstimmt, in denen der GFP-Crn7 überexprimierende Stamm schlechter Bakterien aufnahm als der Wildtyp und viel schlechter als die Deletionsmutante. Unter den Aufnahmeereignissen konnte nur in einem einzigen Fall eine eindeutige Co-lokalisierung mit GFP-Crn7 beobachtet werden. In diesem Fall konnte eine starke Anreicherung von Crn7 um das Phagosom herum beobachtet werden, die kurz nach der Aufnahme des Bakteriums verschwand und an der ursprünglichen Stelle der Aufnahme verblieb, während das Phagosom weiter ins Innere der Zelle befördert wurde (Abb 15).



**Abb. 15: Lebendaufnahme mit GFP-Crn7 und Rhodamin-markierten *L. pneumophila*.** Zu sehen ist eine zeitliche Abfolge einer bakteriellen Aufnahme durch *D. discoideum* AX2 (*gfp::crn7*), in der die Co-lokalisierung des Bakteriums mit GFP-Crn7 beobachtet werden konnte. Dies war der einzige Fall, in dem dieses Phänomen beobachtet wurde. Die Aufnahmen folgen jeweils mit 18 sec aufeinander. Maßstab 10  $\mu$ m.

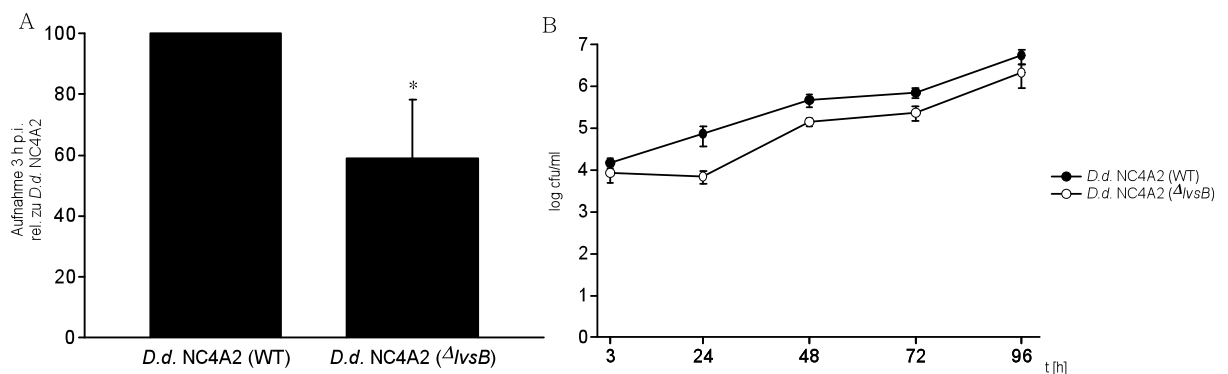
### 2.1.2 Mutanten des Vesikeltransports

#### - Das Lysosom-assoziierte Protein LvsB

LvsB (large volume sphere B) ist der nächste Verwandte zum humanen LYST-Protein (Lysosomal trafficking regulator). Ein Defekt in diesem Gen ist mit dem autosomal rezessiven Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) assoziiert, bei dem Fehler im endo-lysosomalen Verkehr zu Symptomen wie Hypopigmentierung, neurologische Störungen und Immundefizienz führen [Kaplan *et al.*, 2008]. Die Deletion in *Dictyostelium* führt mit vergrößerten angesäuerten Vesikeln auf zellulärer Ebene zu einem ähnlichen Phänotyp wie im Menschen. Daher wird vermutet, dass LvsB ein negativer Regulator der Fusion von endozytotischen

Vesikeln mit Lysosomen ist [Harris *et al.*, 2002]. In der Zelle kommt LvsB in Lysosomen und phagozytischen Vesikeln vor [Kypri *et al.*, 2007].

Wegen der hohen Homologie zum menschlichen Protein, der Rolle in der Reifung von endozytischen Vesikeln und des krankheitsassoziierten Phänotyps, wurde eine vorhandene *lvsB*-Deletion-Mutante für Infektionsstudien verwendet. Hierbei konnte ein deutlicher Unterschied in der Aufnahme der Bakterien nach drei Stunden beobachtet werden. Die Mutante wies in derselben Zeit eine um 40 % reduzierte Aufnahme auf ( $p \leq 0,05$ ) als der isogene Wildtyp *D. d.* NC4A2 (Abb.16). Auch in der Vermehrung konnte ein deutlicher Unterschied in den ersten 24 h nach der Infektion beobachtet werden. In der Mutante erfolgte in den ersten 24 h keine bakterielle Vermehrung statt, während sich die Legionellen im selben Zeitraum 8-fach vermehren konnten.



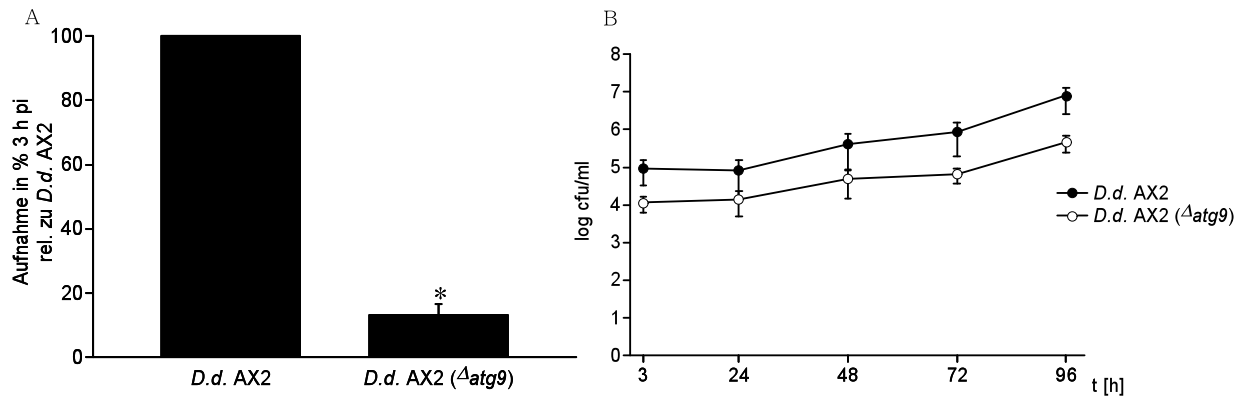
**Abb. 16: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta lvsB$ -Mutante.** (A) Nach drei Stunden können aus der *lvsB*-defizienten Mutante 40 % weniger Bakterien isoliert werden als aus dem Wildtyp ( $p \leq 0,05$ ), was auf einen Aufnahmedefekt hinweist. (B) Die Vermehrung der Bakterien in der Mutante ist in den ersten 24 h viel schlechter als im Wildtyp. Erst nach den ersten 24 h findet eine deutliche Vermehrung statt. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

## - Atg9

Autophagie ist ein zellulärer Prozess, der hauptsächlich unter Nährstoffmangel in Gang gesetzt wird. Durch den Abbau von Proteinen oder Proteinkomplexen (Mikroautophagie) sowie ganzer Organellen (Makroautophagie) können Zellen bis zu einem gewissen Grad den Mangel an Nährstoffen überbrücken und weiterhin überleben. Neben dieser Funktion übernimmt Autophagie auch während der Entwicklung in *Dictyostelium* und in Metazoa eine wichtige Stellung, in dem es den sich differenzierenden Zellen ermöglicht, eigene

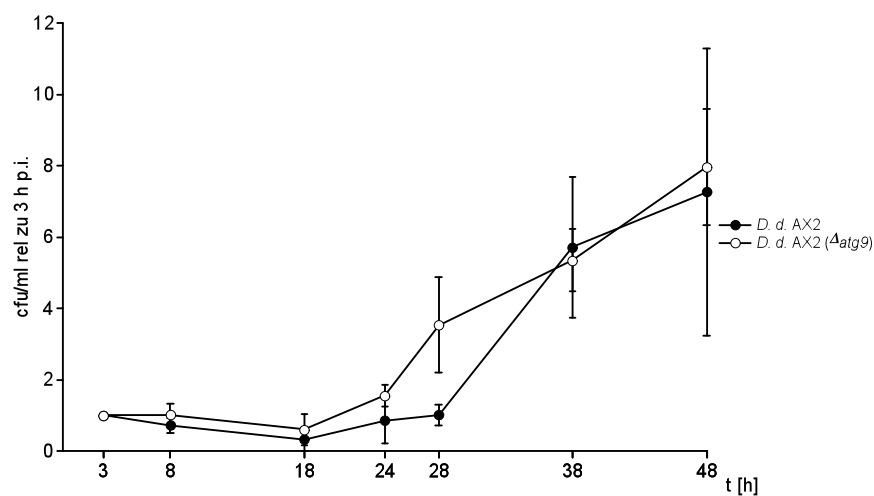
Resourcen zu mobilisieren [Yen und Klionsky, 2008, Kourtis und Tavernarakis 2009]. Im Laufe einer Autophagozytose werden für den Abbau markierte Organelle oder Proteinkomplexe schrittweise von einer zweifachen Doppelmembran umgeben und in den endolysosomalen Kreislauf gebracht.

In neuester Zeit sind auch viele Hinweise dahingehend gesammelt worden, dass Autophagie während einer Infektion mit intrazellulären Pathogenen aktiviert wird. Die genaue Rolle während der Infektion ist jedoch in den einzelnen Fällen nicht eindeutig geklärt. So wird *Porphyromonas perfingis* nach seiner Aufnahme in Autophagosomen transferiert, in denen es persistiert [Dorn *et al.*, 2001]. *Anaplasma phagocytophilum* scheint in der Lage zu sein, Mechanismen der Autophagie zu umgehen [Niu *et al.*, 2008]. Während *Toxoplasma gondii* oder *Burkholderia pseudomallei* durch Autophagie in der Zelle abgebaut werden können [Zhao *et al.*, 2007, Cullinane *et al.*, 2008]. Ob Autophagie während der *Legionelle*-Infektion eine Funktion ausübt, und wenn ja welche diese ist, ist nicht eindeutig geklärt. In einer Studie mit Maus-M $\Phi$  konnte gezeigt werden, dass in den späten Zeitpunkten der Infektion virulente *L. pneumophila* und typische Autophagie-Proteine wie Atg7 oder Atg8 co-lokalisierten und auch der Autophagosomenmarker Cadaverin sich in den *Legionella*-haltigen Kompartimenten anreicherte [Amer *et al.*, 2005]. In einer weiteren Studie in *Dictyostelium* mit einzelnen Deletionsmutanten unterschiedlicher Autophagie-Gene konnte jedoch kein Einfluss dieser Deletionen auf die Vermehrungsrate der Legionellen beobachtet werden [Otto *et al.*, 2004]. Auf der anderen Seite wurde in einer Transkriptomstudie von mit *Legionella*-infizierten Dictyostelien eine Überexpression des *atg9*-Gens sowie die Repression der *atg8*- und *atg16*-Gene beobachtet [Farbrother *et al.*, 2006]. Da *atg9* in der Studie von 2004 nicht getestet wurde, wurde in Kooperation mit Dr. Eichinger von der Universität zu Köln eine *atg9*-Deletionsmutante hergestellt und in Infektionsstudien mit *L. pneumophila* getestet. Eine Deletion von *atg9* führte zu einer ca. 8-fachen Abnahme der Zahl der aufgenommenen Bakterien in den ersten drei Stunden der Infektion (Abb 17A). Erste Infektionsstudien legten jedoch nahe, dass diese geringe Aufnahme keinen weiteren Einfluss auf den Ablauf der Infektion hat, da die Infektionen über die Zeit gesehen mit vergleichbarer Kinetik abliefen (Abb. 17B).



**Abb. 17: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta atg9$ -Mutante.** (A) Die Aufnahme von *L. pneumophila* nach drei Stunden ist in der Mutante etwa um 85 % reduziert verglichen mit der Aufnahme durch den Wildtyp ( $p \leq 0,05$ ). (B) Die Vermehrung von *L. pneumophila* findet im Wildtyp und in der Mutante vergleichbar gut statt. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

Da jedoch die Aufnahme in der  $\Delta atg9$ -Mutante stark reduziert war, war von Interesse den Ablauf in den frühen Zeitpunkten der Infektion genauer anzusehen. Zusätzlich wurde in den Infektionen die MOIs der beiden Stämme so angeglichen, dass nach drei Stunden vergleichbar viele Bakterien aufgenommen wurden. In diesem Fall konnte in den ersten 48 h der Infektion ein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *atg9*-Deletionsmutante beobachtet werden (Abb. 18). Die Zahl der isolierten Bakterien stieg im Falle der *Atg9*-deffizienten Mutante früher an als im Wildtyp.

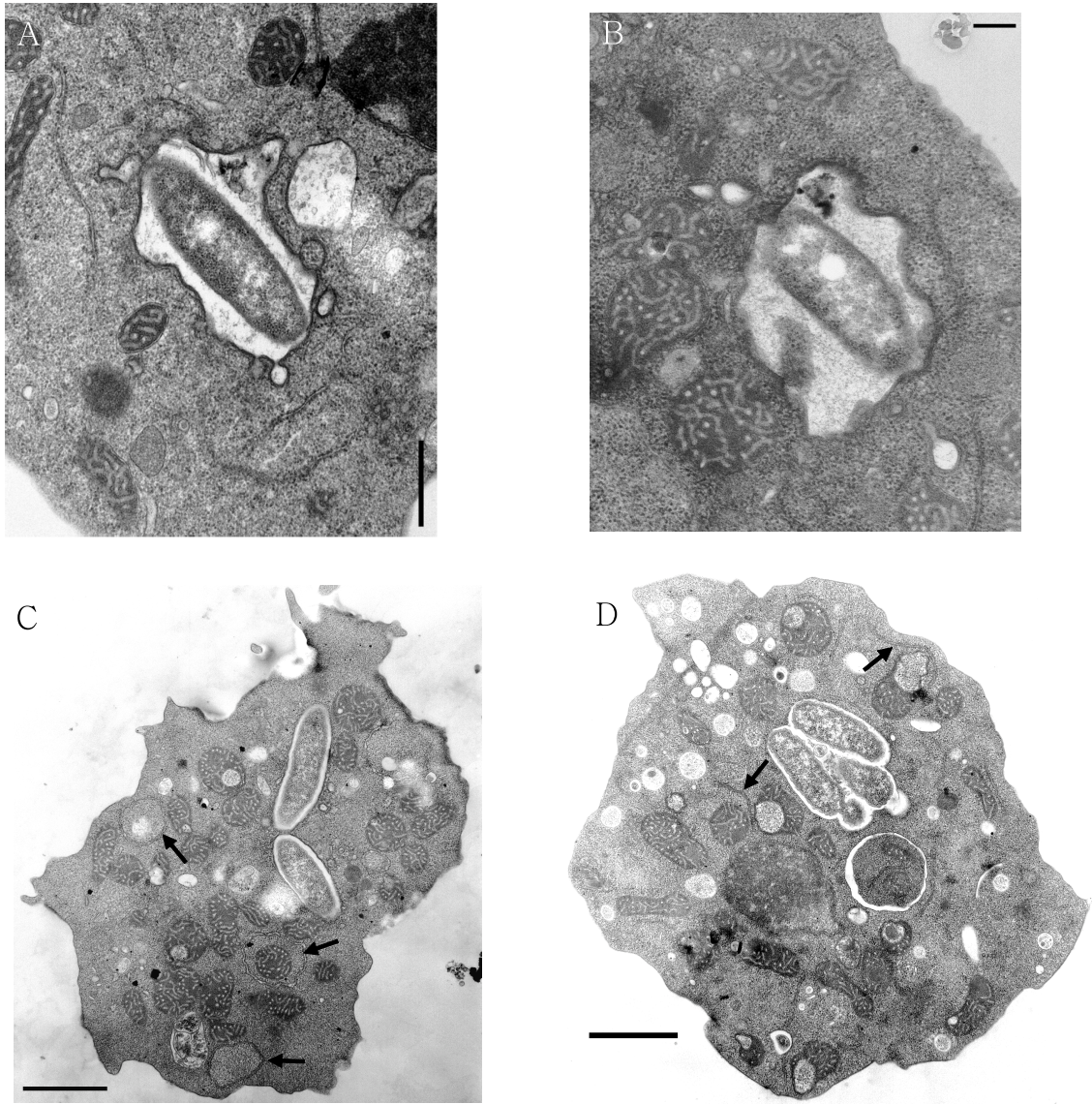


**Abb. 18: Detaillierte Untersuchung des Infektionsablaufs in den frühen Zeitpunkten der Infektion von  $\Delta atg9$ .** Für die Infektion wurden *D.d. AX2* mit einer MOI von 1 und *D.d. AX2 (Δatg9)* mit einer MOI von 7 infiziert. Nach drei Stunden wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamicin getötet

und abgewaschen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geernetet, mechanisch aufgeschlossen und die Zahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren bestimmt. Im Falle der *Δatg9*-Mutante ist eine frühe Zunahme der Bakterienzahl zu beobachten, während *L. pneumophila* im Wildtyp viel länger braucht um eine deutliche Vermehrung zu zeigen. Die cfu-Werte wurden auf den 3 h-Wert des jeweiligen Stammes relativiert. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden infizierte Dictyostelien auch elektronenmikroskopisch untersucht, um mögliche ultrastrukturelle Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante zu identifizieren. Die Zellen wurden dafür 3 oder 20 h nach Infektionsbeginn fixiert und wie unter III.5.3 beschrieben für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den Phagosomen der beiden Stämme beobachtet werden. Jedoch 20 h nach der Infektion konnten Autophagosom-artige Kompartimente in infizierten Wildtyp Dictyostelien beobachtet werden. In der *atg9*-defizienten Mutante war hingegen eine Anreicherung von nicht geschlossenen Doppelmembranen zu sehen, die als Präautophagosomen interpretiert werden könnten (Abb. 19). Dies könnte ein direkter Effekt des Fehlens des Atg9-Proteins sein. Denn Atg9 ist an der Entstehung der Präautophagosomen beteiligt und nicht mehr mit geschlossenen Autophagosomen assoziiert (s.a. Diskussion). Daher könnten die beobachteten Doppelmembranstrukturen ein Zeichen für eine Autophagie-Antwort infizierter Zellen auf die Legionellen sein, die aber wegen des Fehlens des Atg9-Proteins nicht vollständig ausgeführt werden kann und zu dem in den Infektionsversuchen beobachteten früheren Beginn der Vermehrung führt.





**Abb. 19: Elektronenmikroskopische Untersuchung der *L. pneumophila*-Infektion.** *D.d. AX2* (A und C) und *D.d. AX2 (Δatg9)* (B und D) wurden mit *L. pneumophila* (MOI 50) infiziert, 3 (A und B) bzw. 20 h pi (C und D) fixiert und für die Transmissionselektronenmikroskopie vorbereitet. 3 und 20 h nach Infektionsbeginn konnten keine deutlichen ultrastrukturellen Unterschiede am *Legionella*-haltigen Phaagosom beobachtet werden. Jedoch konnten 20 h nach Infektionsbeginn in wildtypischen infizierten Zellen Kompartimente beobachtet werden, die von einer Doppelmembran umgeben waren (Pfeile in C). In der  $\Delta atg9$ -Mutante waren zu diesem Zeitpunkt Doppelmambranen zu beobachten, die im Gegensatz zum Wildtyp nicht geschlossen waren und auf einen unvollständigen Autophagievorgang schließen ließen (Pfeile in D). Maßstäbe: 0,5  $\mu\text{m}$  (A und B), 1  $\mu\text{m}$  (C und D).

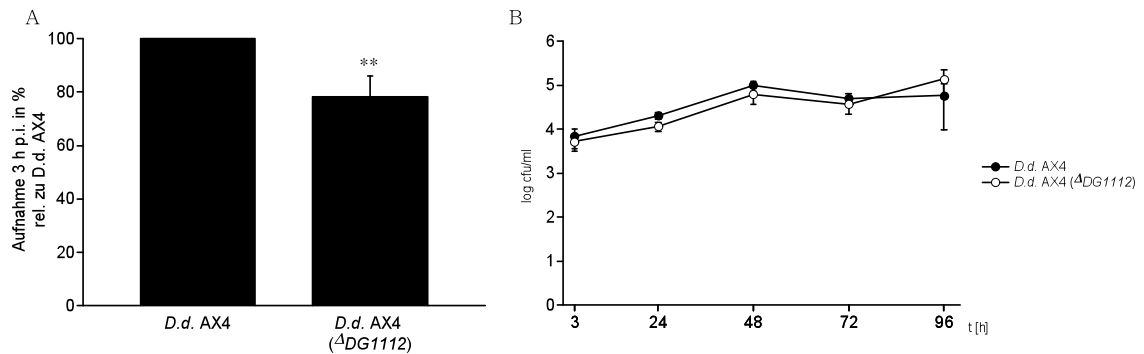
### 2.1.3 Wirtseigene GTPasen

Nach der Aufnahme kann *L. pneumophila* den Reifungsprozess des Phagosom steuern, indem es ins Zytoplasma Effektoren sekretiert, die Wirtsfaktoren sowohl aktivieren als auch deren intrazelluläre Lokalisation beeinflussen können [Nagai *et al.*, 2002, Derré und Isberg, 2004a]. Unter diesen Wirtsfaktoren befinden sich auch Vertreter der kleinen GTPasen wie z.B. der Rab1-GTPase, die mit Hilfe der früh sekretierten Effektoren DrrA und LidA an die Membran des *Legionella*-haltigen Phagosoms rekrutiert wird [Machner und Isberg, 2006 & 2007, Murata *et al.*, 2006]. Ein weiterer etwas später sekretierter Effektor, LepB, hingegen ist in der Lage, das membrangebundene Rab1 zu aktivieren, so dass es GTP hydrolysiert und anschließend vom Phagosom dissoziiert [Ingmundson *et al.*, 2007]. Darüber hinaus ist der Einfluss weiterer wirtseigener GTPasen sowie deren akzessorischer Partner auf die *Legionella*-Infektion nicht auszuschließen und wurde im Zusammenhang dieser Doktorarbeit an zwei Beispielen untersucht.

#### – DG1112

DG1112 ist laut elektronischer Annotation ein GAP (GTPase activating protein) mit einem LRR (leucine rich repeat). Die *DG1112*-Deletionsmutante zeigt einen Defekt in der Entwicklung des Sporenstiels. Bei einer BLAST-Suche tritt dieses Gen als nächster Treffer zum NAIP5 im *Dictyostelium*-Genom auf. NAIP5 ist eine der Schlüsseldeterminanten, die bei der Resistenz bestimmter Inzuchtstämme von Mäusen gegenüber *L. pneumophila* eine Rolle spielt. So sind Makrophagen (MΦ) aus A/J-Mäusen, die ein intaktes NAIP5-Gen besitzen, resistent, wohingegen MΦ aus BALB/C-Mäusen nicht in der Lage sind, die Infektion einzudämmen. Die intakte Variante kann durch die Erkennung der Flagellenuntereinheit der Legionellen Caspase-1 abhängige Apoptose-mechanismen aktivieren, die zu einem schnellen und kontrollierten Tod infizierter MΦ führen. Dadurch wird gleichzeitig die Vermehrung der Bakterien und die Infektion weiterer MΦ verhindert [Derré und Isberg, 2004a, Zamboni *et al.*, 2006, Molofsky *et al.*, 2006].

Die Aufnahme von *L. pneumophila* ist in der *DG1112*-Deletionsmutante um ein 4-faches besser ( $p \leq 0,05$ ) als im Wildtyp *D. d.* AX4, die Vermehrung der Bakterien nach der Aufnahme ist aber nicht beeinträchtigt (Abb. 20).

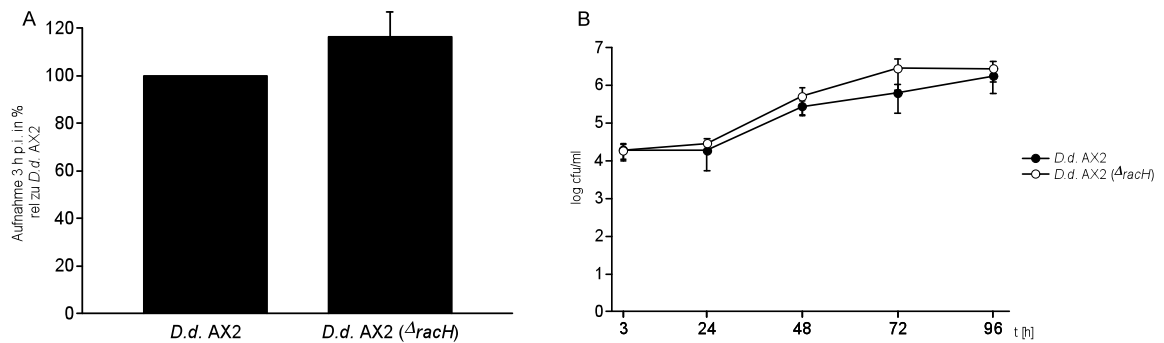


**Abb. 20: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta DG1112$ -Mutante.** (A) Die Aufnahme von *L. pneumophila* nach zwei Stunden ist in der Mutante etwa um 20 % reduziert verglichen mit der Aufnahme durch den Wildtyp ( $p \leq 0,01$ ). (B) Die Vermehrung von *L. pneumophila* findet im Wildtyp und in der Mutante vergleichbar gut statt. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

## - RacH

RacH ist eine kleine GTPase der Familie der Rho-GTPasen. Eine Deletion dieses Gens führt zu Defekten im endosomalen Verkehr, die höchstwahrscheinlich auf das Aktinzytoskelett zurückzuführen sind, da Rho-GTPasen häufig die Aktindynamik einer Zelle beeinflussen [Somesch *et al.*, 2006]. Zudem wurde gezeigt, dass in einer RacH-defizienten Mutante die Vermehrung von *M. marinum* begünstigt wird [Hagedorn und Soldati, 2007].

In Infektionen mit *L. pneumophila*, konnte kein deutlicher Unterschied in der Aufnahme der Bakterien in den ersten 3 h beobachtet werden (Abb. 21A), wohingegen die Vermehrung von *L. pneumophila* in der Mutante begünstigt wurde, sodass in den ersten 48 h ein 4-facher Unterschied zu beobachten war (Abb. 21B).



**Abb. 21: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta racH$ -Mutante.** (A) Die Aufnahme von *L. pneumophila* ist im Wildtyp und der *racH*-Mutante vergleichbar. (B) *L. pneumophila* kann sich in der *racH*-Mutante in den ersten 48 h um den Faktor 4 besser vermehren als im Wildtyp. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

Die Beobachtungen entsprechen denen mit *M. marinum* [Hagedorn und Soldati, 2007], wo die Vermehrung in der Deletionsmutante 2-fach besser ist als im Wildtyp.

#### 2.1.4 Mutanten des Phosphatidylinositol-Signalweges

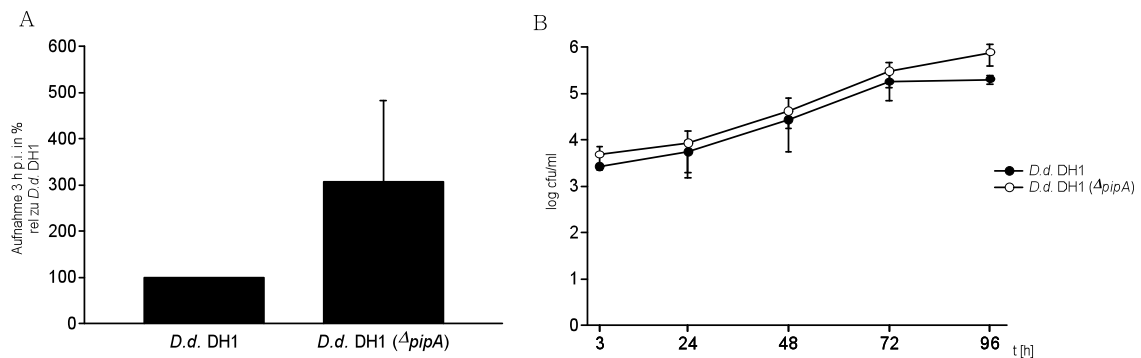
Mitglieder der Familie der RhoGTPasen interagieren mit den unterschiedlichsten Proteinen unter anderem auch mit Phospholipasen des Phosphatidylinositol-Signalweges [Vlahou und Rivero, 2006]. Zudem werden immer mehr *Legionella*-Effektoren identifiziert, die entweder in diesen Signalweg eingreifen [Hilbi, 2006] oder wie im Beispiel von SidM Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P) binden [Weber *et al.*, 2006, Brombacher *et al.*, 2009]. Daher wurden einige vorhandene Mutanten dieses Weges, die zuvor nicht im Zusammenhang der *Legionella*-Infektion untersucht wurden, in Infektionsassays getestet.

##### – Phospholipase C

Das Gen *pipA* kodiert für eine Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C. Diese Klasse von Phospholipasen spaltet Phosphatidylinositolphosphate in das jeweilige Inositolphosphat und Diacylglycerol (DAG). DAG wiederum ist ein wichtiger Second-Messenger, der unter anderem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege

aktiviert. In einer Transkriptomstudie von infizierten Dictyostelien war eine frühe Hochregulation von *pipA* festgestellt worden [Farbrother *et al.*, 2006].

In einem Infektionsassay konnte eine im Durchschnitt 2,5-fach bessere Aufnahme der Bakterien durch die Mutante beobachtet werden (Abb. 22A). Dieser Unterschied war jedoch in einem ungepaarten t-Test nicht signifikant. Die Vermehrungsraten der Bakterien waren im Wildtyp und Mutante vergleichbar (Abb. 22B), sodass ein Einfluss von der *pipA*-kodierte Phospholipase C auf die *Legionella*-Infektion auszuschließen ist.



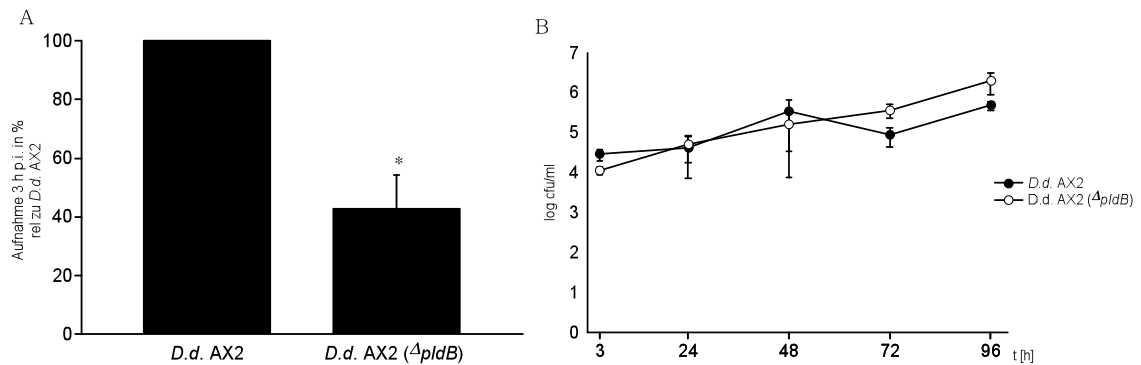
**Abb. 22: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta pipA$ -Mutante.** (A) Die *pipA*-k.o.-Mutante weist eine 2,5-fache bessere Aufnahme von Legionellen auf, die jedoch in einem ungepaarten t-Test nicht signifikant ausfällt. (B) Die Vermehrung von *L. pneumophila* verläuft im Wildtyp und seiner *pipA*-Deletionsmutante vergleichbar ab. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

## - Phospholipase D

*D. discoideum* besitzt sechs Typ-D Phospholipasen. Diese katalysieren die Hydrolyse von Phosphatidycholin in Cholin und Phosphatidylsäure, eine phosphorylierte Form von Diacylglycerol. Die hier untersuchte Phospholipase D wird von dem Gen *pldB* kodiert. Die genauen Zusammenhänge zwischen Phospholipase D (PldB) und der PI-Signalkaskade sind nicht geklärt. Sie wurde jedoch wegen einer möglichen Wechselwirkung mit RacH untersucht.

In einem Infektionsassay konnten nach 3 h 60 % weniger ( $p \leq 0,05$ ) Bakterien aus der Mutante isoliert werden als aus dem Wildtyp (Abb. 23A), was eine geringere Aufnahme der Bakterien vermuten lässt. Die Vermehrung von *L. pneumophila* war jedoch in den ersten 48 h in der Mutante um ein 4-faches

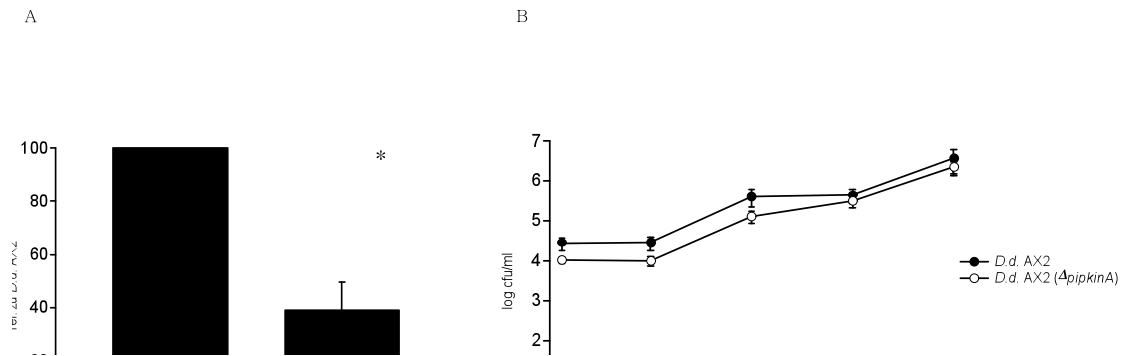
besser als im Wildtyp (Abb. 23B), was auf eine Rolle von Phospholipase D während des intrazellulären Lebenszyklus von *L. pneumophila* hindeutet.



**Abb. 23: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta pldB$ -Mutante.** (A) Die Aufnahme von *L. pneumophila* ist in der *pldB*-Mutante gegenüber dem Wildtyp um ca. 60 % reduziert ( $\leq 0,05$ ). (B) Die Vermehrung von *L. pneumophila* ist in den ersten 48 h in der *pldB*-Mutante um ein 4-faches besser als im Wildtyp. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

## - Phosphatidylinositol-4-phosphat-Kinase

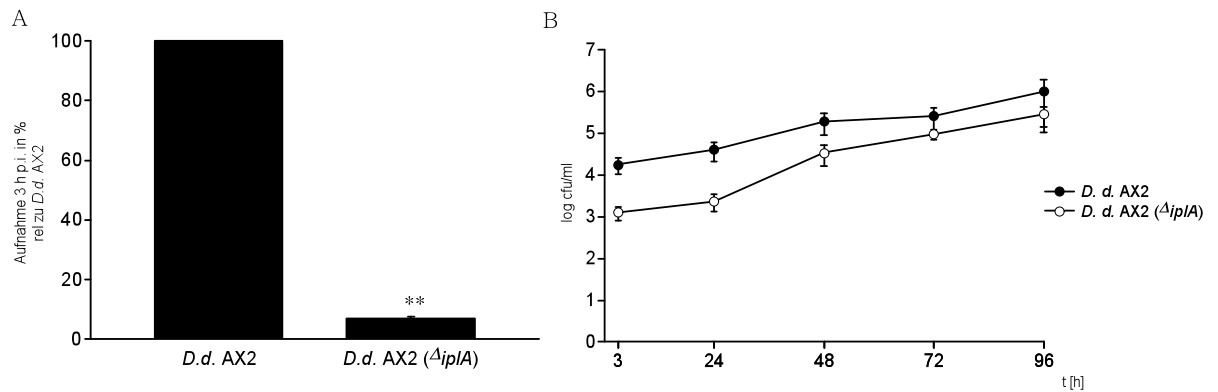
PipkinA ist eine Phosphatidylinositolphosphatkinase, die durch Diacylglycerol aktiviert wird, und in wichtigen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt sowie an der Genexpression beteiligt ist [Guo *et al.*, 2001]. Sie katalysiert die 5'-Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P) zu PI(4,5)bis-P. PI(4)P ist ein bereits identifiziertes Phosphoinositid, für das *L. pneumophila* sekretierte Effektoren besitzt, die es binden können [Weber *et al.*, 2006]. Da PipkinA durch die Konvertierung einen Einfluss auf den zellulären Vorrat an PI(4)P hat, ist ein Einfluss auf die Infektion zu erwarten. Zudem waren in einer zuvor durchgeführten Transkriptomstudie drei Gene mit Homologien zu *pipkinA* während der Infektion hochreguliert [Farbrother *et al.*, 2006]. Die Untersuchung der  $\Delta pipkinA$ -Mutante zeigte, dass die Aufnahme von *L. pneumophila* etwa 60 % ( $p \leq 0,05$ ) reduziert war (Abb. 24A), die Vermehrung über 96 h verlief jedoch mit einer vergleichbaren Kinetik (Abb. 24B)



**Abb. 24: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta pipkinA$ -Mutante.** (A) Die Aufnahme von *L. pneumophila* ist in der *pipkinA*-Deletionsmutante 60 % schlechter ( $p \leq 0,05$ ) als im Wildtyp. Die Vermehrung der Bakterien in den ersten 48 h ist in beiden Stämmen vergleichbar. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

### - Inositol(1,4,5)*tris*-phosphat-Rezeptor (IplA)

Das Gen *iplA* (Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-like) kodiert für ein Membranprotein, das in der ER-Membran lokalisiert ist und Inositol(1,4,5)trisphosphat binden kann. Dadurch wird eine als  $Ca^{2+}$ -Kanal dienende Domäne im selben Protein aktiviert, sodass  $Ca^{2+}$  aus dem ER ins Cytosol gelangen kann und als ein Second-Messenger dient. Somit ist dieses Protein ein wichtiger Teil des PI-Signalweges. Zudem konnte eine aktuelle Studie zeigen, dass IplA in *Dictyostelium* eine wichtige Rolle in der Autophagie spielt [Lam und Golstein, 2008, Lam *et al.*, 2008]. Die Untersuchung der  $\Delta iplA$ -Mutante ergab, dass diese 90 % ( $p \leq 0,01$ ) schlechter *L. pneumophila* aufnahm als der Wildtyp (Abb. 25A). Diese Aufnahmedeffizienz wurde jedoch durch eine bessere Vermehrung in den ersten 48 h größtenteils aufgeholt, sodass der Unterschied zwischen Wildtyp und der *iplA*-Deletionsmutante nach 96 h deutlich geringer ausfiel als am Anfang der Infektion (Abb. 25B). *L. pneumophila* konnte sich nach der Aufnahme in den ersten 48 h in der Deletionsmutante 2,5-fach besser vermehren als im Wildtyp.



**Abb. 25: Invasions- und Infektionsstudien der  $\Delta iplA$ -Mutante.** (A) Die Aufnahme von *L. pneumophila* ist in der *iplA*-Mutante um 90 % geringer als im Wildtyp ( $p \leq 0,01$ ). (B) Die Vermehrung von *L. pneumophila* ist in den ersten 48 h ca. 2,5-fach besser im Wildtyp. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

### 2.1.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mutierte Stämme von *D. discoideum* verwendet, die in unterschiedlichen zellulären Prozessen beeinträchtigt waren. Bis auf die *cap::bsr*-Mutante handelte es sich hierbei um Mutanten, bei denen durch homologe Rekombination ein Gen vollständig zerstört wurde. Bei der *cap::bsr*-Mutante war die Expression des Gens auf 5 % reduziert, was bereits einen Phänotyp ergab. Hier stand keine Deletionsmutante zur Verfügung, da die vollständige Zerstörung des Cyclase-assoziierten Proteins (CAP) nicht möglich war.

Es wurde in allen Mutanten die Auswirkung der jeweiligen Deletion auf die Aufnahme sowie Vermehrung von *L. pneumophila* untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die einzelnen betroffenen Gene wurden anhand des zellulären Prozesses gruppiert, an dem sie beteiligt sind.



Tab. 9: Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen während der Infektion verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp.

	Genotyp	Aufnahme im Vergleich zum WT	Vermehrung
Aktinzytoskelett	<i>cap ::bsr</i> (Cyclase-assoziiertes Protein)	10-fach verringert	vergleichbar über die gesamte Zeit
	<i>crn7-k.o.</i> (Coronin 7)	8-fach besser	vergleichbar über die gesamte Zeit
Vesikeltransport	<i>lvsB-k.o.</i> (Large volume sphere B)	2,5-fach verringert	verzögert in den ersten 24 Stunden
	<i>atg9-k.o.</i> (Autophagy related protein 9)	8-fach verringert	schnellerer Replikationsbeginn in den ersten 24 Stunden
kleine GTPasen	<i>DG1112-k.o.</i> (developmental gene 1112/ RasGAP)	1,25-fach schlechter	vergleichbar über die gesamte Zeit
	<i>racH-k.o.</i> (Rho-GTPase)	kein signifikanter Unterschied	4-fach besser in den ersten 48 Stunden
Phosphatidylinositol-Signalkaskade	<i>pipA-k.o.</i> (Phospholipase C)	2,5-fach besser (nicht signifikant)	vergleichbar über die gesamte Zeit
	<i>pldB-k.o.</i> (Phospholipase D)	1,6-fach verringert	4-fach besser in den ersten 48 Stunden
	<i>pipkinA-k.o.</i> (Phosphatidylinositol-6-Kinase)	1,6-fach verringert	vergleichbar über die gesamte Zeit
	<i>iplA-k.o.</i> (Inositol(1,4,5)tris-phosphat-Rezeptor)	10-fach verringert	2,5-fach besser in den ersten 48 Stunden

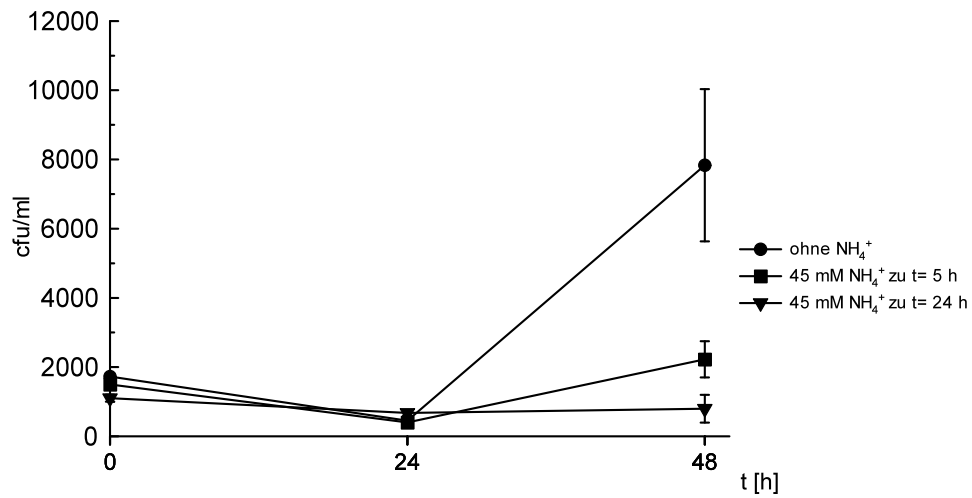
## 2.2 Gezielte Manipulation des pH-Wertes während der *Legionella*- Infektion beeinflusst die Replikation

Obwohl *L. pneumophila* nachgewiesener Weise in einem neutralen Kompartiment vorliegt [Horwitz, 1983; Horwitz und Maxfield, 1984], gibt es Untersuchungen in Monozyten, die eine späte Ansäuerung des *Legionella*-haltigen Phagosoms beweisen. Eine Ansäuerung in den späten Infektionsphasen ist sogar für die Fortsetzung der Infektion wichtig. Wenn dieser Prozess in MΦ durch die Zugabe von Protonenpumpen-Inhibitoren unterbunden wurde, konnte keine bakterielle Vermehrung mehr beobachtet werden [Sturgill-Koszycki und Swanson, 2000].

In Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass in *D. discoideum* die Ansäuerung des Phagosoms durch *L. pneumophila* in den frühen Zeitpunkten verhindert wird. Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss einer späten Ansäuerung des *Legionella*-haltigen Phagosoms auf den Ablauf der Infektion zu beobachten. Dafür wurde der endosomale pH durch die Zugabe von  $\text{NH}_4^+$  in das Infektionsmedium gezielt manipuliert [Hart und Young, 1991].  $\text{NH}_4^+$  liegt unter physiologischen Bedingungen mit seiner Base  $\text{NH}_3$  im Gleichgewicht.  $\text{NH}_3$  ist ungeladen und daher membranpermeabel. Es diffundiert durch biologische Membranen, bis es in einem angesäuerten Kompartiment, wie einem späten Endosom, protoniert wird und wegen seiner Ladung nicht mehr zurückgelangen kann. Somit reichert sich  $\text{NH}_4^+$  in sauren zellulären Kompartimenten und ruft die Neutralisation des pHs hervor.

Der intrazelluläre pH wurde während der Infektion durch die Zugabe von 45 mM  $\text{NH}_4^+$  5 h bzw. 24 h nach Infektionsbeginn neutralisiert. Anschließend wurde die Auswirkung der Neutralisierung des pHs auf die Vermehrung der Bakterien beobachtet, indem die Kolonie-bildenden Einheiten bestimmt wurden (Abb. 26). Der Einfluss von  $\text{NH}_4^+$  war am deutlichsten, wenn es 24 h nach Infektionsbeginn hinzugefügt wurde. In diesem Fall konnte keine Vermehrung in den folgenden 24 h beobachtet werden. Die Zugabe von  $\text{NH}_4^+$  5 h nach Infektionsbeginn hatte zur Folge, dass die Vermehrung 4-fach schlechter ausfiel als in der nicht behandelten Infektion. Dennoch konnte eine gewisse Vermehrung beobachtet werden. Dies ist womöglich auf die Metabolisierung des

$\text{NH}_4^+$  zurückzuführen, wodurch eine gewisse Ansäuerung dennoch stattfinden kann.

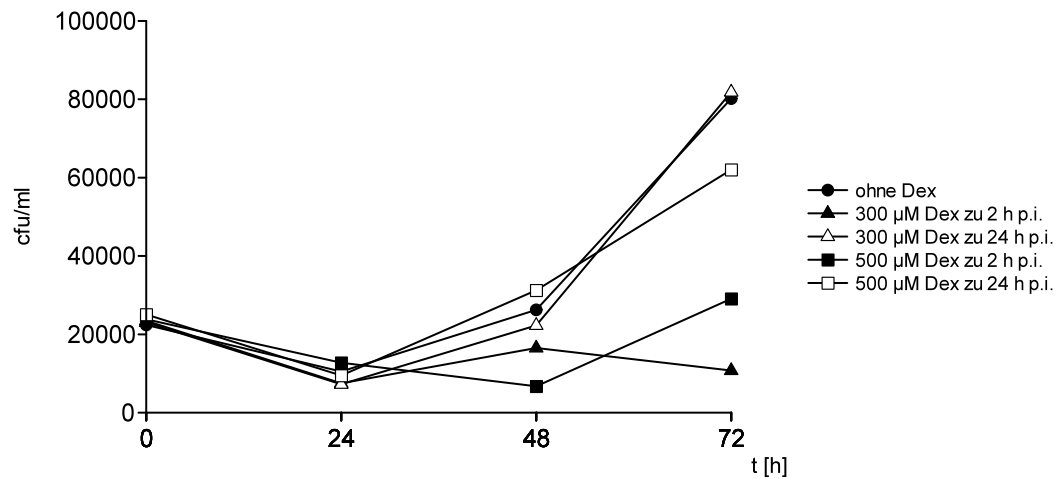


**Abb. 26: Einfluss von 45 mM  $\text{NH}_4^+$  auf die *Legionella*-Infektion.** Die Zugabe von 45 mM  $\text{NH}_4^+$  hat Einfluss auf die Vermehrung von *L. pneumophila*. Wenn  $\text{NH}_4^+$  zu 5 oder 24 h nach der Infektion zugegeben wird, wird eine deutliche Abnahme in der bakteriellen Replikation beobachtet. Der Effekt ist am deutlichsten, wenn die Zugabe 24 h nach Infektionsbeginn erfolgt. Die durch die Zugabe verursachte Neutralisierung des Phagosoms führt zu einer kompletten Inhibition der Vermehrung. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionen mit je doppeltem Ansatz wieder.

### 2.3 Einfluss von Eisenchelatoren auf die *Legionella*-Infektion

Eisen ist ein essentielles Spurenelement, das Legionellen für ihr Wachstum benötigen. Die Verfügbarkeit von Eisen ist im Wirt durch Eisen bindende Proteine wie Ferritin oder Transferrin sowie Enzyme, die Eisen als Kofaktor verwenden, sehr begrenzt. *L. pneumophila* wiederum besitzt Mechanismen, um Eisenreserven des Wirtes zu mobilisieren. Darunter befinden sich die Fähigkeit Hämin zu binden [O'Connel *et al.*, 1996], oder Legiobactin als Eisenchelator zu produzieren [Liles *et al.*, 2000]. Außerdem konnte anhand von *D. discoideum* gezeigt werden, dass Nramp1 (*natural resistance associated membrane protein 1*), ein Metalltransporter des Phagosoms, bei der Kontrolle der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* eine wichtige Rolle spielt. In *Dictyostelium* Mutanten, denen dieses Protein fehlt, können sich die Bakterien viel besser vermehren als im Wildtyp [Peracino *et al.*, 2006]. Die aktuelle Hypothese ist, dass Nramp1 im Laufe der Phagosomenreifung mit späten Endosomen und Phagosomen assoziiert und das freie Eisen aus dem Lumen ins Cytosol befördert [Lam-Yuk-Tseung *et al.*, 2006]. Somit steht dieses wichtige Spurenelement den Legionellen nicht mehr zur Verfügung.

In dieser Studie wurde mit Hilfe von Eisenchelatoren die Rolle von Eisen für *L. pneumophila* in den Zellen untersucht. Dafür wurde der Eisenchelator Desferoxamin (Dex) zu unterschiedlichen Zeitpunkten den infizierten Zellen dazugegeben, und den Verlauf der Infektion durch Ausplattieren der Bakterien dokumentiert. Es wurden 300  $\mu\text{M}$  oder 500  $\mu\text{M}$  Dex zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten den infizierten Zellen hinzugefügt. Dabei konnte sowohl ein konzentrationsabhängiger als auch ein zeitabhängiger Einfluss der Zugabe von Dex beobachtet werden (Abb. 27). Die Zugabe 2 h nach der Infektion hatte bei 300 und 500  $\mu\text{M}$  Dex einen stärker inhibierenden Effekt als die Zugabe 24 h nach Infektionsbeginn. Bei einer Zugabe zu einem späten Zeitpunkt der Infektion konnte mit Dex die Eisenrekrutierung durch *L. pneumophila* nicht mehr effektiv unterbunden werden, sodass die Bakterien sich vergleichbar wie in unbehandelten Zellen vermehren konnten.



**Abb. 27: Einfluss von Desferrioxamin auf die Legionella-Infektion.** Der Eisenchelator Desferrioxamin (Dex) hat eine zeitabhängige Wirkung auf die Legionella-Vermehrung. Eine frühe Zugabe (2 h p.i.) von 300 oder 500 µM Dex kann die Vermehrung über den gesamten Zeitraum deutlich inhibieren, während die Zugabe 24 h nach Infektionsbeginn, erst ab 500 µM eine schwache Wirkung zeigt. Ansonsten verläuft die Infektionskurve ähnlich der nicht behandelten Infektionen.

## 2.4 Transkriptomanalysen zur *Mycobacterium marinum*- Infektion in *Dictyostelium discoideum*

Mit der Entwicklung der Chip- und der dazugehörigen Microarray-Technologie, besitzt die Molekularbiologie ein Werkzeug, das auf viele biologisch relevante Ebenen angewandt werden kann. Eine davon ist die Untersuchung von Änderungen in der Genexpression von Organismen als Antwort auf Umweltstimuli. Dafür werden Oligonukleotidsonden, die komplementäre Sequenzen zu mRNA-Sequenzen eines Organismus sind, auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Anschließend wird mRNA aus den mit dem erwünschten Stimulus behandelten Zellen gewonnen, in cDNA umgewandelt, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf die Chips appliziert. Vorhandene cDNAs geben abhängig von ihrem relativen Anteil in der Gesamt-cDNA ein Signal einer bestimmten Stärke. Die Signale einer behandelten Probe können somit mit den Signalen einer unbehandelten oder andersartig behandelten Probe verglichen werden.

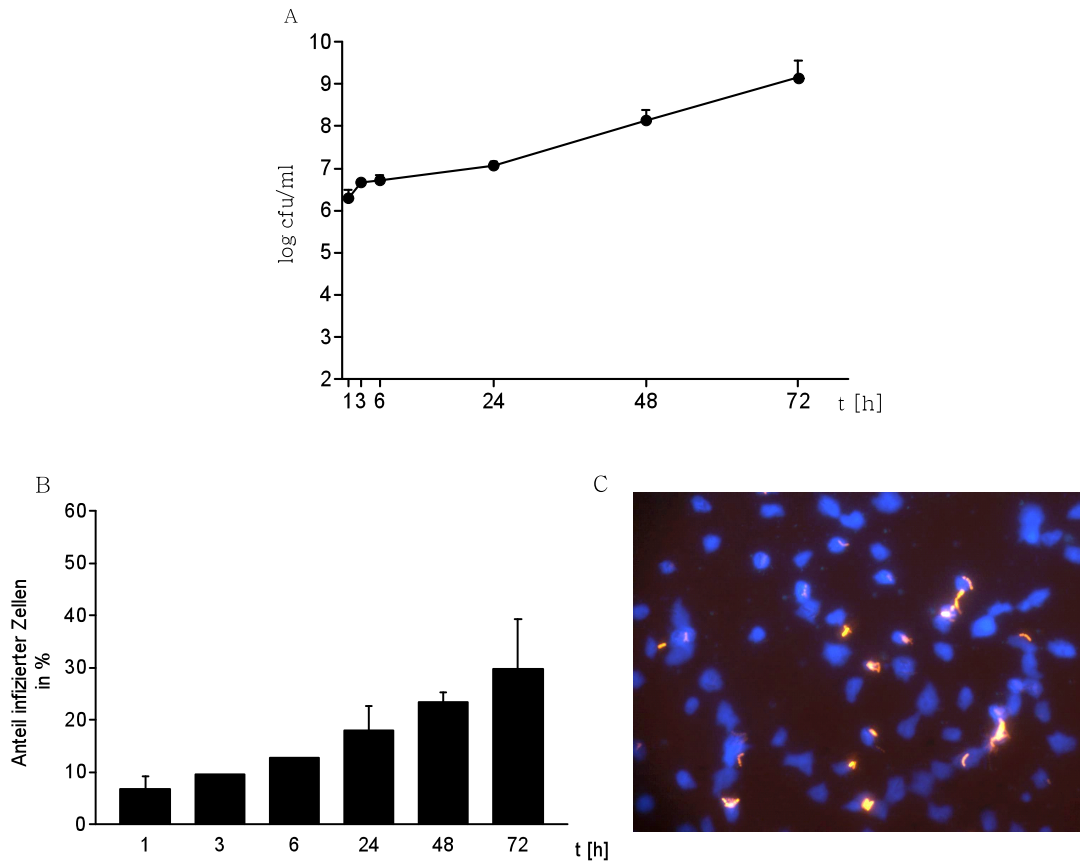
Von *D. discoideum* gibt es ein Oligonukleotidarray, auf dem ca. 6000 Sonden und somit etwa die Hälfte des Genoms gespottet sind. Dieses Array wurde bereits im Zusammenhang der *L. pneumophila*-Infektion verwendet. Dafür wurden Dictyostelien mit *L. pneumophila* Wildtyp, seiner avirulenten  $\Delta dotA$ -Mutante und *L. hackeliae*, einer avirulenten Spezies, infiziert und die transkriptionelle Antwort auf Infektion mit diesen unterschiedlichen Stämmen mit der von nicht infizierten Dictyostelien bzw. untereinander verglichen [Farbrother *et al.*, 2006]. Diese Arbeit hatte bereits einen sehr ausführlichen Überblick über die an der Infektion beteiligten zellulären Mechanismen geliefert. In dieser Arbeit wurde der analoge Ansatz verfolgt, und die Arbeiten mit *L. pneumophila* teilweise auf *Mycobacterium marinum* übertragen. Dadurch ist auch der Vergleich von zwei intrazellulären Pathogenen möglich, die die Phagosomenreifung manipulieren.

*M. marinum* ist ein sehr naher Verwandter von *M. tuberculosis*, der in Fischen und bei Übertragung auf den Menschen auch auf dessen Haut Granulome verursachen kann. Seine optimale Wachstumstemperatur beträgt 25–30 °C, weshalb sich die Infektion des Menschen nur auf die Haut beschränkt. Dennoch

hat *M. marinum* eine Generationszeit von 4 h, bei *M. tuberculosis* liegt diese bei 20 h. Hinzu kommt, dass die genetische Manipulation von Virulenzdeterminanten, die große Ähnlichkeiten zu *M. tuberculosis* aufweisen, einfacher ist. Wegen dieser Vorteile wird *M. marinum* als ein geeignetes Modell für den Erreger der humanen Tuberkulose betrachtet [Tobin und Ramakrishnan, 2008]. Dass *D. discoideum* mit *M. marinum* infiziert werden kann, konnte bereits gezeigt werden [Solomon *et al.*, 2003]. Es konnten inzwischen auch Coronin 1, Vacuolin B und RacH mit Hilfe von *Dictyostelium* als wichtige Wirtsfaktoren identifiziert werden [Solomon *et al.*, 2003, Hagedorn und Soldati, 2007].

#### 2.4.1 Infektion von *D. discoideum* mit *M. marinum* DSM 44750

Als Voraussetzung für die Transkriptomanalysen wurden zunächst Infektionsversuche durchgeführt, um die Vermehrung von *M. marinum* in *Dictyostelium* zu bestätigen und den Anteil der infizierten Zellen über die Zeit zu beurteilen, da dies für die Anwendbarkeit der Transkriptomstudie von Bedeutung ist. Typischerweise wird in Transkriptomanalysen vorausgesetzt, dass die isolierte mRNA aus einer homogenen Kultur stammt. Im Falle einer Infektion nimmt jedoch die Anzahl der infizierten Zellen mit der Zeit zu und die mRNA stammt sowohl aus infizierten als auch aus nicht infizierten Zellen. Die Infektionen wurden durchgeführt wie unter III.4.2 durchgeführt und die Vermehrung von *M. marinum* über 72 h beobachtet. Die Infektionen zeigten, dass sich der Stamm DSM 44750 in *Dictyostelium* sehr gut vermehren konnte (Abb. 28A). Für die Bestimmung des Anteils infizierter Zellen wurden Proben aus den Infektionen entnommen und die Bakterien wie unter III.5.2 beschrieben mit Rhodamin B und die Dicytostelien mit DAPI gefärbt. Durch die Überlagerung der beiden Bilder wurden intrazelluläre Bakterien geortet und somit die Zahl der infizierten Zellen zu der Zahl der insgesamt ausgezählten Zellen relativiert. Parallel zu der Zunahme der Bakterienzahl konnte eine stetige Zunahme der Anzahl infizierter Zellen von zunächst 10 % auf 30 % bei 72 h beobachtet werden (Abb 28B und C).

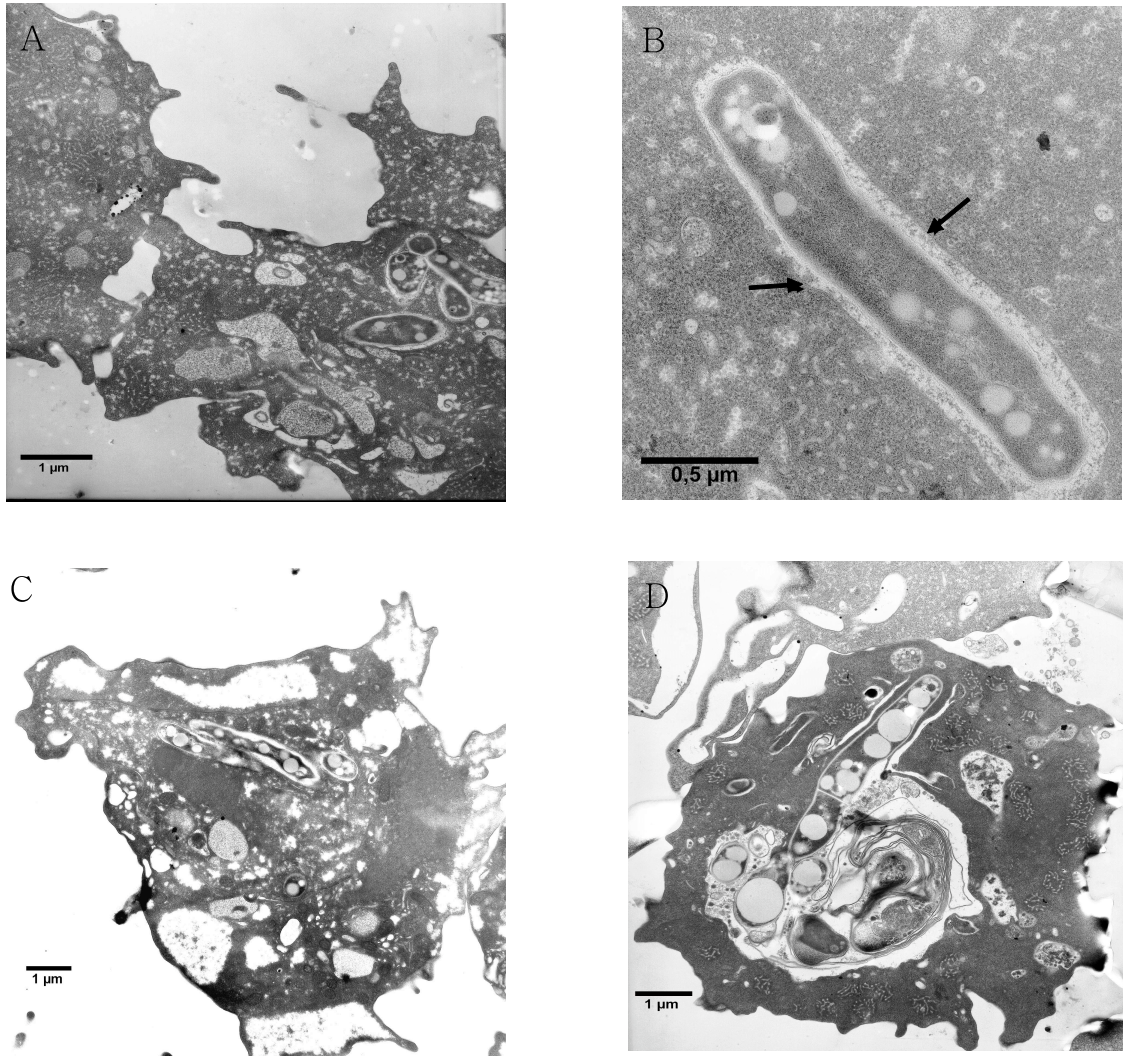


**Abb. 28: Infektion von *D. discoideum* mit *M. marinum* (DSM 44750).** (A) Die Co-inkubation von *M. marinum* mit *D. discoideum* führt zu einer Vermehrung der Bakterien über 72 h. (B) Parallel zur Vermehrung steigt in einer 72 h Infektion der Anteil infizierter Zellen von ca. 10 % auf 30 %. (C) Der Anteil infizierter Zellen wurde mit Hilfe der Rhodamin-Färbung der Bakterien und DAPI-Färbung der Dictyostelien bestimmt. Nach der Färbung wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und die Co-lokalisierung der Signale ausgewertet. Es ist ein exemplarisches Bild von 24 h nach Infektionsbeginn gezeigt. Die Graphen geben Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionen wider.

Zusätzlich wurden die Infektionen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht, indem zu den Zeitpunkten 3, 28 und 48 h infizierte Zellen fixiert und präpariert wurden (Abb 28). Bereits 3 h nach Infektionsbeginn konnten viele infizierte Zellen beobachtet werden, die mindestens ein Bakterium beinhalteten. Die intrazellulären Bakterien waren von einer Membran umgeben, was auf deren Vorkommen in Phagosomen hindeutete (Abb. 29A und B). Bereits nach 28 h konnten als Folge der intrazellulären Vermehrung Phagosomen mit multiplen Bakterien beobachtet werden (Abb. 29C). Phagosomen der 48 h-Präparate hatten neben Bakterien auch viele Membraneinschlüsse und einige von denen



hatten auch ihre Intaktheit verloren, was auf eine Zerstörung des Phagosoms hindeutete (Abb. 29D).



**Abb. 29: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur *M. marinum*-Infektion.** Mit *M. marinum* infizierte Dictyostelien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. (A) 3 h nach Infektionsbeginn sind bereits erste infizierte Zellen zu beobachten. (B) Die intrazellulären Bakterien sind 3 h nach Infektionsbeginn von einer Membran umgeben (Pfeile) und somit im Phagosom. (C) 28 h Nach Infektionsbeginn sind Phagosomen mit multiplen Bakterien zu beobachten. (D) 48 h nach Infektionsbeginn sind viele Phagosomen nicht mehr intakt, da die Mycobakterien aus diesen ausbrechen.

### 2.4.2 Die transkriptionelle Antwort von *D. discoideum* auf die Infektion mit *M. marinum*

Die Transkriptomanalysen mit Hilfe von Microarrays wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Eichinger aus der Universität zu Köln durchgeführt, und die Daten von Frau M.Sc. Lorna Moll ausgewertet worden. Im Folgenden wird eine Zusammenfassung dieser Daten aufgeführt.

Das vordergründige Ergebnis der Transkriptomanalysen war, dass über die Zeit gesehen die Zahl der regulierten Gene stark variiert, mit einem Maximum bei 24 h und einer erneuten Zunahme bei 72 h nach Infektionsbeginn. Zudem war ein Großteil der regulierten Gene 1,3- bis 1,5-fach stärker reguliert (Tab. 10).

Tab. 10: Übersicht zur Anzahl der differentiell regulierten Gene in *D. discoideum* während der *M. marinum*-Infektion.

Zeitpunkt der Infektion [h]	Differentiell regulierte Gene >1,3 fach (>1,5 fach)		
	hochreguliert	runterreguliert	Summe
1	23 (3)	0 (0)	23 (3)
3	73 (27)	1 (0)	74 (27)
6	58 (25)	7 (1)	65 (26)
24	155 (52)	61 (27)	216 (79)
48	56 (13)	10 (3)	66 (16)
72	113 (37)	34 (9)	147 (46)

Die Anzahl der im Vergleich zu nicht infizierten Dictyostelien um mindestens 1,3-fach hoch- oder runterregulierten Gene zu den einzelnen Zeitpunkten ist aufgelistet. In Klammer ist die Anzahl der Gene gegeben, die mindestens 1,5-fach dereguliert waren.

Die einzelnen Gene auf dem Microarraychip sind anhand ihrer zellulären Funktion in 16 Kategorien eingeteilt, inklusive dreier Kategorien für die keine bekannte Funktion beschrieben ist. Anhand des Anteils der deregulierten Gene einer Kategorie und deren Anteil im gesamten Array kann ein Quotient errechnet werden. Dieser hilft Kategorien zu identifizieren, die während der Infektion überrepräsentiert (>1,5) oder unterrepräsentiert sind (<0,5). So fallen 66,84 % der differentiell regulierten Gene in die Kategorien der Gene unbekannter Funktion. Da aber diese Kategorien auch 68,7 % der gespotteten Sonden ausmachen, ist dies weiter nicht außergewöhnlich. Genauso kann die

Subkategorie Aminosäuremetabolismus nicht als angereichert betrachtet werden, obwohl 37 der deregulierten Gene dieser Kategorie angehören und somit die zweitgrößte Klasse darstellen. Die Liste der infektionsrelevanten angereicherten und unterrepräsentierten Kategorien ist in Tabelle 11 widergegeben. Am deutlichsten waren die Kategorien Homöostase (13), Zellwand und Plasmamembran (8,83), Lipid (7,18) und Secondmessengersynthese (6,5) angereichert. Die Subkategorie der Zytoskelettorganisation (0,47) und G-Proteine (0,28) waren hingegen unterrepräsentiert.

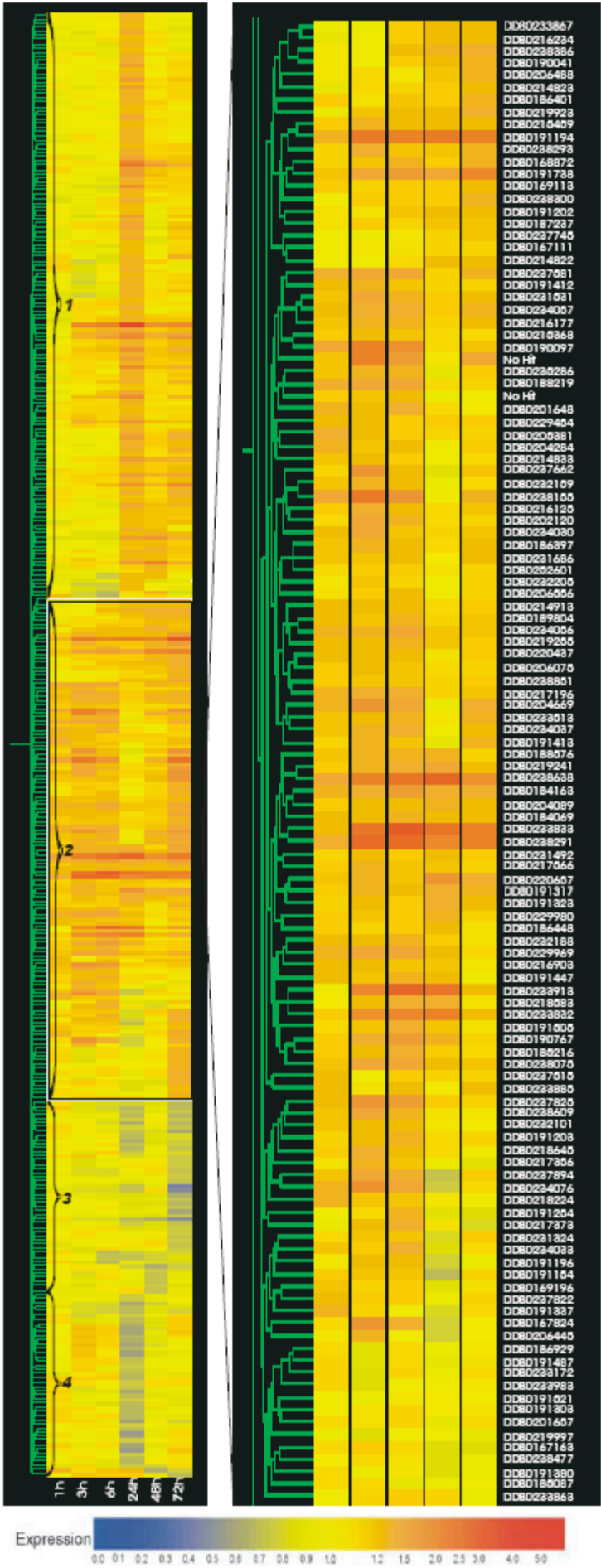
Tab. 11: Auflistung der angereicherten und unterrepräsentierten Subkategorien der differentiell regulierten Gene während der Infektion mit *M. marinum*.

cDNA-Proben		Differentiell regulierte Gene		Quotient	Subkategorie
Anzahl	Anteil in %	Anzahl	Anteil %		
6	0,11	1	0,26	2,36	<b>3. Transkription</b> 3.1 rRNA Synthese
9	0,17	2	0,53	3,12	<b>4. Translation</b> 4.2 Translationsfaktoren
7	0,13	1	0,26	2	<b>5. Proteinturnover</b> 5.6 Andere
3	0,06	2	0,53	8,83	<b>6. Zellproliferation</b> 6.1 Zellwand und Plasmamembran
6	0,11	3	0,79	7,18	<b>7. Transportunterstützung</b> 7.4 Lipid
30	0,55	1	0,26	0,47	<b>9. Bewegung</b> 9.2 Zytoskelettorganisation
1	0,02	1	0,26	13	<b>10. Stressantwort</b> 10.1 Homöostase
14	0,26	3	0,79	3,04	10.2 Stressantwort
8	0,15	2	0,53	3,53	10.4 Detoxifikation
2	0,04	1	0,26	6,5	<b>11. Signaltransduktion</b> 11.2 Secondmessenger

Es sind angegeben die Anzahl der cDNA-Sonden auf dem Array und deren prozentualer Anteil (a) sowie Anzahl der jeweils differentiell regulierten Gene und deren Anteil (b). Der Quotient bildet sich aus  $a:b$ . Die unterrepräsentierte Gruppe der Gene der Zytoskelettorganisation ist grau hinterlegt.

Die während der *M. marinum*-Infektion differentiell regulierten 380 Gene wurden mit Hilfe von GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies,

<http://www.chem.agilent.com>) in Cluster gruppiert, die jeweils ein ähnliches Regulationsmuster aufwiesen. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnten 4 Cluster identifiziert werden: Cluster 1 umfasste all die Gene, die hauptsächlich zu 24 h hochreguliert wurden. In Cluster 2 kamen Gene vor, die früh in der Infektion hochreguliert wurden und über die gesamte Infektionszeit hochreguliert blieben. Cluster 3 und 4 beinhalteten runterregulierte Gene, wobei in Cluster 3 hauptsächlich zu 72 h und in Cluster 4 zu 24 h runterregulierte Gene angesammelt waren. Unter den vier Clustern waren die interessantesten Gene in Cluster 2 versammelt. Obwohl 20 % der Gene (24 von 120) dieses Clusters der Gruppe der unbekannten Gene angehörte, waren 10,83 % Glycoproteine oder Lektine sowie 10 % Gene des Vesikeltransports (Abb. 30).



**Abb.30: Clusteranalyse der während der *M. marinum*-Infektion in *D. discoideum* differentiell regulierten Gene.** Die 380 differentiell regulierten Gene wurden mit Hilfe der GeneSpring 7.2-Software (Agilent Technologies) anhand ihrer Expressionsmuster in vier Cluster gruppiert. Im linken Abschnitt sind die vier Cluster im Überblick zu sehen. Unten sind die jeweiligen Zeitpunkte aufgelistet, aus denen die Expressionsdaten stammen. Im rechten Abschnitt ist Cluster 2 größer aufgelöst und die jeweiligen DDB-Nummern der Gene ist angegeben. Der Farbbalken dient der qualitativen Beurteilung der Expressionsmuster: Blau, runterreguliert; Gelb; nicht reguliert; Rot, hochreguliert. (Quelle: Masterarbeit von Frau M.Sc. Lorna Moll.)

### 2.4.3 Vergleich der *L. pneumophila*- und *M. marinum*-Infektion

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die transkriptionellen Veränderungen in *D. discoideum* während der Infektion mit *L. pneumophila* und *M. marinum* zu vergleichen. Beide Krankheitserreger, der eine gram negativ der andere gram positiv, sind intrazelluläre Pathogene und können die Phagosomenreifung im Wirt zu ihrem Vorteil unterbinden. Daher ist von großem Interesse, Aufschlüsse dahingehend zu finden, ob sie in ihrem Wirt ähnliche oder unterschiedliche transkriptionelle Veränderungen auslösen. Die transkriptionelle Antwort auf die Infektion mit *L. pneumophila* wurde bereits untersucht [Farbrother *et al.*, 2006]. Die jetzt vorliegenden Daten zur *M. marinum*-Infektion ermöglichten den Vergleich der Daten.

Bereits in *L. pneumophila* stellte sich der Zeitpunkt 24 h als der mit den meisten differentiell regulierten Genen heraus. Diese Beobachtung konnte auch im Falle der *M. marinum*-Infektion gemacht werden. Daher wurde eine vergleichende Analyse auf die 24 h nach Infektionsbeginn differentiell regulierten Gene der beiden Infektionen konzentriert. Zu diesem Zeitpunkt waren 123 Gene in der *L. pneumophila*-Infektion und 137 in der *M. marinum*-Infektion hochreguliert. Jeweils 24 dieser Gene sind in beiden Fällen hochreguliert (Tab. 12). Hier fällt auf, dass vier Glycoproteine oder Lektine sowie drei detoxifizierende Enzyme auftauchen. 24 h nach Infektionsbeginn sind in der *L. pneumophila*-Infektion 93 Gene runterreguliert, in der *M. marinum*-Infektion hingegen 44. Jeweils 19 dieser sind den beiden Infektionen gemeinsam (Tab. 13). Hier ist eine Ansammlung von Proteinen zu beobachten, die beim Proteinturnover (Synthese oder Abbau) eine wichtige Rolle spielen. Zudem ist die Anwesenheit des Autophagieproteins Atg16 von Interesse, da die differentielle Regulation Makroautophagie-assoziiierter Gene bereits in der *Legionella*-Infektion auffallend war.

Tab. 12: Auflistung der Gene, die sowohl bei einer Infektion mit *L. pneumophila* als auch mit *M. marinum* zu 24 h hochreguliert wurden.

	DDB ID	Beschreibung
Vergleich <i>M. marinum</i> und <i>L. pneumophila</i> hochreguliert	DDB0231688	galactose-binding domain-containing protein, similar to discoidin I
	DDB0238638	unknown
	DDB0233913	putative outer membrane adhesin like protein
	DDB0191194	gp64 and disintegrin-like, cysteine-rich protein
	DDB0238181	glutathione S-transferase
	DDB0238156	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein, glucose/ribitol dehydrogenase family protein
	DDB0169006	MEGF11 PROTEIN (KIAA1781)
	DDB0238168	unknown
	DDB0238299	agglutinin domain-containing protein, highly similar to geneDDB0238300 (80% identity)
	DDB0233914	putative SAM dependent methyltransferase
	DDB0229453	putative protein serine/threonine kinase, Nuclear Dbf2-Related kinase
	DDB0185089	component of the counting factor (CF) complex, countin, which includes CF60, CF50, CF45-1, and CtnA (countin)
	DDB0238213	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
	DDB0238634	unknown
	DDB0231779	proliferating cell nuclear antigen, subunit of DNA polymerase holoenzyme that clamps the replicating polymerase to DNA
	DDB0238744	Prespore-specific protein 3B
	DDB0205556	mitomycin radical oxidase-like protein
	DDB0214926	alternative oxidase
	DDB0201569	alpha-mannosidase
	DDB0187155	short-chain oxidoreductase
	DDB0233234	PhoPQ-activated pathogenicity-related protein, conserved hypothetical protein; similar to AprA, an autocrine repressor of proliferation
	DDB019195	5 CG1637 CG1637-PC, isoform C
	DDB0190831	unknown
	DDB0191000	Arsenite Inducible Protein family member (aip-1)

Farblich hervorgehoben sind Glykoproteine und Lektine (Blau) sowie Detoxifizierungsenzyme (Gelb).

Tab. 13: Auflistung der Gene, die sowohl bei einer Infektion mit *L. pneumophila* als auch mit *M. marinum* zu 24 h runterreguliert wurden.

	DDB ID	Beschreibung
Vergleich <i>M. marinum</i> und <i>L. pneumophila</i> runter reguliert	DDB0191230	ABC transporter G family protein
	DDB0218347	AgCP9056
	DDB0191099	flavohemoglobin, nitric oxide reductase activity
	DDB0186878	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein
	DDB0231570	alkaline phosphatase, exhibits a punctuate pattern in immunofluorescence that most likely represents vesicles
	DDB0188059	P46595 Ubiquitin-conjugating enzyme
	DDB0231138	kynurenine-oxoglutarate transaminase, kynurenine aminotransferase
	DDB0185040	protein disulfide isomerase, catalyzes the rearrangement of disulfide bonds in proteins
	DDB0238338	Similar to <i>Mortierella alpina</i> , stearyl-CoA desaturase
	DDB0167628	Protein enhancer of sevenless 2B (Protein E(sev)2B) (SH2-SH3 adapter protein drk) (Downstream of receptor kinase)
	DDB0215341	autophagy protein 16, ortholog of the mammalian ATG16L1, which is involved in autophagy
	DDB0232962	cytochrome P450 family protein
	DDB0191461	homogentisate 1,2-dioxygenase
	DDB0191154	cell division cycle protein 48, CDC48 family AAA ATPase, highly conserved protein; CDC48 in yeasts; TERA in human; together with ufd1 and npl4, involved in recognition of polyubiquitinated proteins and their presentation to the 26S proteasome for degradation
	DDB0237894	unknown
	DDB0219925	calcium-binding protein
	DDB0217955	CMP/dCMP deaminase, zinc-binding domain-containing protein
	DDB0252680	signal recognition particle receptor alpha subunit, mediates the delivery of nascent secretory proteins to the endoplasmic reticulum by the signal recognition particle (SRP)
	DDB0231580	no hit

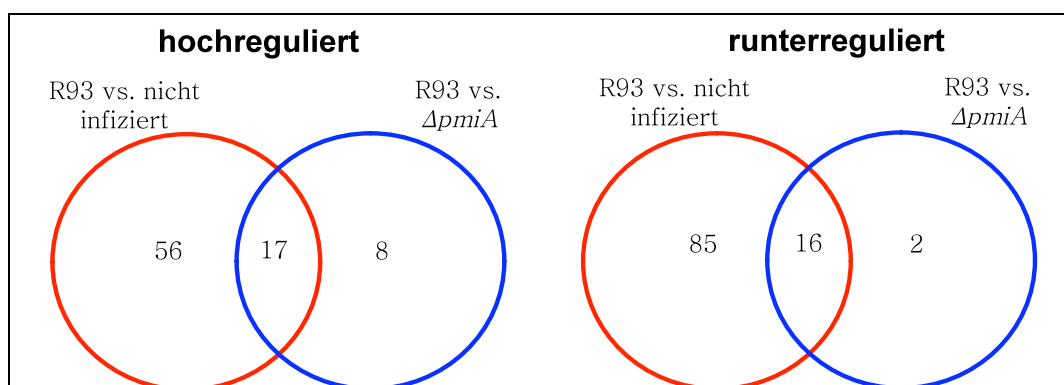
Farblich hervorgehoben sind Proteine des Proteinturnovers (Grün) und das Autophagieprotein Atg16 (Rot).



#### 2.4.4 Vergleich der transkriptionellen Antwort von *D. discoideum* auf die Infektion von *M. marinum* R93 und seiner $\Delta pmiA$ -Mutante

Die mit *M. marinum* DSM44750 erhaltenen Ergebnisse zur transkriptionellen Antwort von *Dictyostelium* auf die Infektion gaben Anlass dazu, eine analoge Studie zu machen wie sie bereits für *L. pneumophila* durchgeführt wurde. Dafür wurden ein Wildtypstamm und seine nachgewiesener Weise attenuierte Mutante ausgesucht. Die Suche in der Literatur lieferte *M. marinum* R93 und seine  $\Delta pmiA$ -Mutante als potentielle Kandidaten für diese Studie. *pmiA* wurde in *M. marinum* R93 in einer genomweiten Deletionsstudie identifiziert. Die Deletion dieses Gens führte dazu, dass die Bakterien die Phagolysosom-Fusion nicht mehr verhindern konnten und in Mäusen attenuiert waren [Robinson *et al.*, 2007]. Die Stämme wurden für die Infektion verwendet und die transkriptionelle Antwort von *D. discoideum* auf die beiden Stämme 24 h nach Infektionsbeginn untersucht sowie miteinander verglichen.

Ein Vergleich der Infektionen zeigte, dass der größte Unterschied in der Zahl der differentiell regulierten Gene zwischen den mit Wildtyp infizierten Dictyostelien und den nicht infizierten Dictyostelien auftrat. Zu 24 h waren in diesem Fall 73 Gene hoch- und 101 Gene runterreguliert. Wohingegen ein Vergleich der mit Wildtyp und der mit der  $\Delta pmiA$ -Mutante infizierten Dictyostelien mit 25 hoch- und 18 runterregulierten Genen geringer ausfiel. Die Zahl der Gene, die in beiden Vergleichen hoch- bzw. runterreguliert waren und somit als spezifisch für die Infektion mit dem Wildtyp betrachtet werden können, war im Falle der hochregulierten Gene 17 und im Falle der runterregulierten Gene 16 (Abb. 31).



**Abb. 31: Übersicht zur Anzahl der differentiell regulierten Gene der vergleichenden Infektionen mit *M. marinum* R93 und dessen  $\Delta pmiA$ -Mutante.** Die 24 h nach Infektionsbeginn hoch- und runterregulierten Gene der nicht infizierten bzw. mit *M. marinum* R93 oder mit *M. marinum* R93 ( $\Delta pmiA$ ) infizierten Dictyotellen wurde miteinander verglichen und mit Hilfe von Venn-Diagrammen dargestellt. Im Vergleich zu nicht infizierten sind in mit *M. m.* R93 infizierten Dictyostelien 73 Gene hoch- bzw. 101 Gene runterreguliert. Im Vergleich zu der  $\Delta pmiA$ -Mutante sind in mit *M. m.* R93 infizierten Dictyostelien hingegen 25 Gene hoch- und 18 Gene runterreguliert. Von den hochregulierten sind 17 und von den runterregulierten 16 in beiden Vergleichen vorhanden und somit als für die Infektion mit *M. m.* R93 spezifisch zu betrachten.

Die gemeinsam auftretenden und somit für die Infektion mit R93 als spezifisch zu betrachtenden Gene sind in den Tabellen 14 und 15 aufgelistet. Die aus diesen Vergleichen erhaltenen Gene wurden auch mit den bereits von *L. pneumophila* bekannten Daten verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass von den hoch- und runterregulierten Genen jeweils zehn auch in der *Legionella*-Infektion differentiell reguliert waren. Ein Großteil dieser war in beiden Infektionen 24 h nach Infektionsbeginn ähnlich reguliert. Bei den Hochregulierten waren lediglich Ponticulin A, ein Actin-bindendes Protein, sowie *DDB\_G0268156*, eine AAA-Typ ATPase, in der *Legionella*-Infektion runterreguliert (Tab. 14). Unter den runterregulierten Genen befanden sich *DDB\_G0270098*, ein Ubiquitin-assoziiertes Zink-Finger-Protein, sowie Argonaut B, ein Einzelstrang-RNA-bindendes Protein, die in der *Legionella*-Infektion hochreguliert waren (Tab. 15).

Tab 14: Auflistung der Gene, die sowohl im Vergleich mit nicht infizierten als auch mit der  $\Delta pmiA$ -Mutante in *M. m.* R93 hochreguliert sind.

Gen (Protein)	Gen-ID	Funktion/Eigenschaft
<i>ponA</i> (Ponticulin)	DDB_G0293522	actin binding/cortical actin plasma membrane anchoring
<i>DDB_G0268156</i>	DDB_G0268156	ATP binding (AAA type ATPase)/chaperone/ER
<i>lagC</i> (loose aggregate C)	DDB_G0280531	signal protein/cell adhesion molecule/IPT/TIG domain-containing protein/integral membrane protein
<i>29C</i>	DDB_G0291255	n.d./similar to DDB_G0291255
<i>estA</i>	DDB_G0286925	putative lipase/esterase/thioesterase domain containing protein
<i>CYP519E1</i> (cytochrome P450 family protein)	DDB_G0286419	putative iron/metal binding oxidoreductase
<i>veg111</i> (hyaluronidase)	DDB_G0282371	hydrolysis of hyaluronic acid
<i>manA</i> (alpha mannosidase)	DDB_G0292206	hydrolysis of mannose/lysosome
<i>manA</i> (alpha mannosidase)	DDB_G0292206	hydrolysis of mannose/lysosome
<i>DDB_G0295779</i>	DDB_G0295779	EGF-like domain-containing protein
<i>DDB_G0288109</i>	DDB_G0288109	unknown
<i>DD3-3</i>	DDB_G0283095	DD3-3 is defective in glycosylation of <i>csaA</i> and cell adhesion. A knockout of DD3-3 results in cells that aggregate 1.5 h before wild-type and express lower levels of <i>regA</i> and <i>splA</i>
<i>DDB_G0269890</i>	DDB_G0269890	unknown
<i>DDB_G0270922</i>	DDB_G0270922	possible role in multicellular organismal development
<i>pcnA</i> (proliferating cell nuclear antigen)	DDB_G0287607	subunit of DNA polymerase holoenzyme that clamps the replicating polymerase to DNA
<i>cadA</i> (Ca-dependent cell adhesion)	DDB_G0285793	Ca-dependent cell-cell adhesion/ruffle/plasma membrane/lysosome
<i>DDB_G0293566</i>	DDB_G0293566	glycoside hydrolase family 25 protein/peptidoglycan catabolic processes

Gene, die auch in einer *Legionelle*-Infektion 24 h nach Infektionsbeginn hochreguliert sind, sind rot hervorgehoben. Gene, die in einer *Legionella*-Infektion 24 h nach Infektionsbeginn runterreguliert sind, sind grau hervorgehoben.

Tab. 15: Auflistung der Gene, die sowohl im Vergleich mit nicht infizierten als auch mit der  $\Delta pmiA$ -Mutante in *M. m.* R93 runterreguliert sind.

Gen (Protein)	Gen-ID	Funktion/Eigenschaft
<b>DDB_G0293202</b>	<b>DDB_G0293202</b>	<b>TRAF-type zinc finger-containing protein meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein</b>
<i>DDB_G0272720</i>	<i>DDB_G0272720</i>	unknown
<b>DDB_G0278163</b>	<b>DDB_G0278163</b>	<b>TM2 domain-containing protein/putative transmembrane protein</b>
<b>DDB_G0288651</b>	<b>DDB_G0288651</b>	<b>patatin family protein/lipid metabolic processes</b>
<i>DDB_G0270098</i>	<i>DDB_G0270098</i>	<i>unknown/ZZ-type zinc finger containing C terminal ubiquitin associated (UNA) domain</i>
<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>
<b>dymA (Dynamin)</b>	<b>DDB_G0277849</b>	<b>GTPase/phagocytic vesicle</b>
<b>DDB_G0272182</b>	<b>DDB_G0272182</b>	<b>putative arginine deiminase</b>
<b>hspF (heat shock protein F)</b>	<b>DDB_G0273561</b>	<b>heat shock protein Hsp20 domain- containing protein</b>
<b>DDB_G0268318</b>	<b>DDB_G0268318</b>	<b>unknown</b>
<b>lyT2-4</b>	<b>DDB_G0274291</b>	<b>glycoside hydrolase family 24 protein putative T4-like lysozyme</b>
<i>DDB_G0289775</i>	<i>DDB_G0289775</i>	<i>unknown</i>
<i>DDB_G0280211</i>	<i>DDB_G0280211</i>	<i>unknown</i>
<i>agnB (Argonaut)</i>	<i>DDB_G0290377</i>	<i>single stranded RNA binding/RNA- interference</i>
<i>tmem50</i> (Transmembrane family member protein 50)	<i>DDB_G0281983</i>	<i>unknown</i>
<i>DDB_G0277389</i>	<i>DDB_G0277389</i>	<i>unknown</i>

Gene, die auch in einer *Legionelle*-Infektion 24 h nach Infektionsbeginn runterreguliert sind, sind grün hervorgehoben. Gene, die in einer *Legionella*-

Infektion 24 h nach Infektionsbeginn hochreguliert sind, sind grau hervorgehoben.

#### 2.4.5 Zusammenfassung

*Mycobacterium marinum* ist ein naher verwandter von *M. tuberculosis* und ist wie dieser ein intrazellulärer Parasit von Makrophagen. Da *M. marinum* für die Infektion sehr ähnliche Virulenzfaktoren und Strategien verwendet, dabei aber die Vorteile hat, leichter und unter S2-Bedingungen kultivierbar zu sein, wurde zunächst die Infektion von *D. discoideum* unter den gegebenen Laborbedingungen bestätigt, um anschließend mit Hilfe eines DNA-Microarrays von *D. discoideum* die transkriptionellen Veränderungen während der Infektion zu beobachten. Die Infektion zeigte, dass in Gegenwart von *D. discoideum* über 72 h eine stetige Vermehrung der Bakterien zu beobachten war. Mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie konnten die intrazelluläre Lokalisation sowie Vermehrung der Bakterien bestätigt werden.

Die Transkriptomanalyse infizierter Dictyostelien zeigte, dass über den Zeitraum von 72 h vielseitige Genregulationsvorgänge stattfanden, und die meisten Gene 24 h nach Infektionsbeginn differentiell reguliert waren. Ein Großteil dieser Gene gehörte zwar den Klassen unbekannter Funktion sowie nicht annotierter Gene an, jedoch konnte auch eine Anreicherung von Genen mit bekannten Funktionen beobachtet werden. So waren Gene für Zellwand und Plasmamembran, Secondmessengersynthese, Lipide oder rRNA-Synthese und Translation angereichert. Auf der anderen Seite waren Gene für G-Proteine und Zytoskelettorganisation unterrepräsentiert. Ein wichtiges Cluster der differentiell regulierten Gene waren die Gene, die hauptsächlich 24 h nach Infektionsbeginn hochreguliert wurden. Unter diesen waren interessanterweise viele Gene für Glykoproteine sowie Lektine und Vesikeltransport, die beide ca. 10 % der Gene dieses Clusters ausmachten.

Ein Vergleich der Infektionen mit *M. marinum* und *L. pneumophila* zeigte, dass in beiden Infektionen 24 h nach Infektionsbeginn die meisten Gene hoch- oder

runterreguliert wurden. 24 der hoch- und 19 der runterregulierten Gene hatten die beiden Infektionen gemeinsam. Unter den hochregulierten Genen hatten den größten Anteil Glykoproteine und Lektine sowie Detoxifizierungsenzyme. Unter den runterregulierten Genen, waren viele, die an der Proteinbiosynthese bzw. am Abbau von Proteinen beteiligt sind. Interessanterweise war in beiden Infektionen 24 h nach Infektionsbeginn *atg16*, ein für die Autophagie wichtiges Protein, runterreguliert.

Die transkriptionellen Analysen wurden erweitert, indem *D. discoideum* mit *M. marinum* R93 und dessen attenuierten  $\Delta pmiA$ -Mutante infiziert und anschließende Transkriptomanalysen durchgeführt wurden. Die  $\Delta pmiA$ -Mutante war, wie bereits in Makrophagen und Mäusen gezeigt, auch in *D. discoideum* attenuiert. Da zuvor die meiste differentielle Genregulation 24 h nach Infektionsbeginn beobachtet wurde, wurde auch in diesem Fall der 24 h-Zeitpunkt genauer analysiert. Das Transkriptom mit *M. marinum* R93 infizierter Dictyostelien wurde mit dem der nicht infizierten oder mit dem der mit der  $\Delta pmiA$ -Mutante infizierten Bakterien verglichen. In beiden Fällen waren 17 Gene hoch- bzw. 16 Gene runterreguliert. Es konnte keine Anreicherung von Genen einer bestimmten zellulären Funktion beobachtet werden. Jedoch ergab der Vergleich mit der *L. pneumophila*-Infektion, dass jeweils 10 der Gene auch in der *Legionella*-Infektion differentiell reguliert wurden. Jeweils 8 von denen waren auf dieselbe Weise reguliert.

## V. DISKUSSION

### 1. Molekulare Interaktion zwischen Mip und humanem Collagen IV

In erster Linie ist *L. pneumophila* ein intrazellulärer Pathogen, der eine Vielzahl von Virulenzfaktoren besitzt, die ihm ermöglichen ein weites Wirtsspektrum an phagozytisch aktiven Zellen zu seinem eigenen Vorteil zu manipulieren [Fields *et al.*, 2002]. Wie neuere Studien zeigen, sind diese Virulenzfaktoren in ihrer Spezifität und der Art und Weise, wie sie Wirtsfaktoren manipulieren, in hohem Grade an diese angepasst [Machner und Isberg 2007, Ingmundson *et al.*, 2007, Isberg *et al.*, 2009].

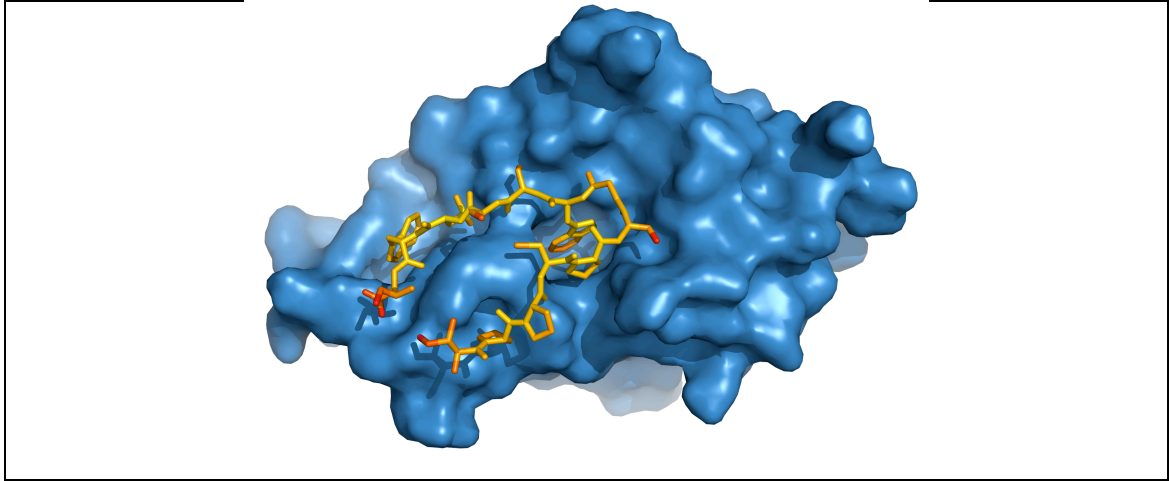
Dennoch hat die Legionärskrankheit, wie sie sich in Säugetieren manifestiert, bedingt durch die Lokalisation in der Lunge auch eine extrazelluläre Komponente, die für den Ablauf der Krankheit von großer Bedeutung ist. Typische Symptome sind Fibrinolyse mit starker Infiltration von Neutrophilen und die damit verbundene Schädigung der Alveoli. Diese Symptome beeinträchtigen einerseits die Überlebenschancen und andererseits sind sie auch Vorstufen für die Infiltration von Gewebe und die anschließende Ausbreitung der Bakterien im Körper [Lück und Steinert, 2006]. Die Mechanismen, die der extrazellulären Pathogenität von *L. pneumophila* beitragen, sind weitestgehend unbekannt, benötigen aber in Anbetracht des klinischen Fortgangs der Krankheit eine intensive Untersuchung.

Infektionsstudien mit Meerschweinchen haben das Mip-Protein (**M**acrophage **i**nfectivity **p**otentiator) als ein Virulenzfaktor der extrazellulären Pathogenität identifiziert. *Legionella*-Mutanten, die kein Mip Protein besaßen oder monomeres bzw. in seiner PPIase-Aktivität beeinträchtigtes Mip exprimierten, waren in diesem Tiermodell deutlich attenuiert. Zudem wurde das Lungengewebe der Tiere viel weniger geschädigt und die Zahl der aus der Milz isolierten Bakterien ging drastisch zurück [Köhler *et al.*, 2003, Wagner *et al.*, 2007]. Diese Studien zeigten auch, dass Mip mit der extrazellulären Matrix (ECM) wechselwirken kann und an Collagen IV innerhalb der ECM eine besondere Affinität besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Studien zur Mip-Collagen IV-Interaktion fortgeführt und eine Bindungssequenz innerhalb des Collagen IV-Moleküls identifiziert. Mit Hilfe von biochemischen Experimenten wurde die Interaktion zwischen Mip und der identifizierten Peptidsequenz (P290) bestätigt. In einem PPIase-Assay konnte durch die Zugabe dieses Peptids die PPIase-Aktivität von Mip konzentrationsabhängig inhibiert werden. Zudem konnte die Kopräzipitation von Mip durch immobilisiertes P290 mit dem PPIase-Inhibitor FK506 gestört werden. Diese Ergebnisse, die eine Bindung des P290 in die PPIase-aktive Domäne des Mip-Proteins nahe legten, konnten auch mit Hilfe von NMR-Studien bestätigt werden. In diesen Messungen, die von Dipl. Phys. Kai Schwedhelm (Institut für Experimentielle Physik V, Universität Würzburg) durchgeführt wurden, konnte eine Wechselwirkung zwischen P290 und den Aminosäuren der PPIase-Domäne gemessen werden, die auch für die Bindung von PPIase-Inhibitoren wie Rapamycin wichtig sind [Ceymann *et al.*, 2008]. Außerdem konnte ein Computer-basiertes Modell des Komplexes in einer wässrigen Lösung erstellt werden (Abb. 32). Laut dieses Modells passt sich das Peptid in die PPIase-Domäne des Mip-Proteins topologisch optimal an und bildet dabei eine Haarnadel-ähnliche Struktur. Die Struktur wird durch mehrere Wasserstoffbrücken stabilisiert, die zwischen Mip und P290 gebildet werden. Die hydrophobe Tasche der PPIase-Domäne komplett von der Tryptophanseitenkette auf Position 8 und teilweise von der Prolinseitenkette auf Position 5 des Peptids besetzt. Diese Art der Interaktion ist auch aus dem Rapamycin-Mip-Komplex bekannt, in dem der Pipecolin-Ring des Rapamycinmoleküls die hydrophobe Tasche besetzt. Zudem sind an der Bindung von P290 und Rapamycin mit Asp142 und Tyr185 dieselben kritischen Aminosäuren der PPIase-Domäne beteiligt. Asp142 bildet mit Ser9 und Tyr185 mit Pro3 von P290 Wasserstoffbrücken. Der so entstandene Komplex ist in einer 18 ns langen Computersimulation äußerst stabil (Abb. 32). Eine ähnliche Simulation mit FKBP12, der nächsten homologen humanen PPIase, ergab hingegen, dass während der Simulation der P290-FKBP12-Komplex instabiler wird, da insbesondere die Enden von P290 schwächere intermolekulare Bindungen mit FKBP12 eingehen können (Kai Schwedhelm, persönliche Mitteilung). Die biochemischen Befunde und die Erkenntnisse aus den NMR-

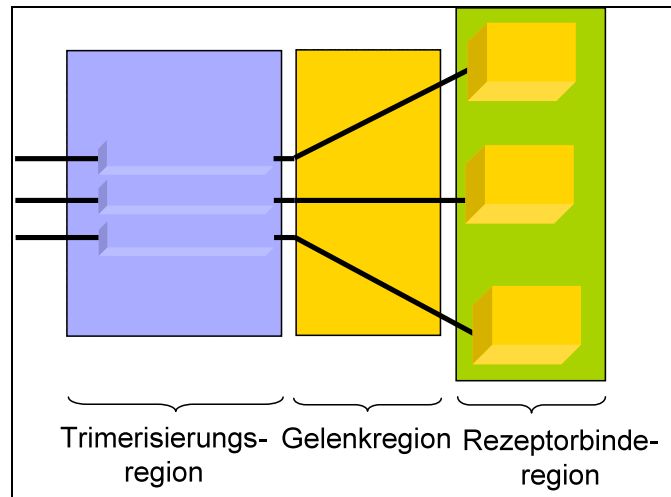


Messungen liefern somit Argumente dafür, dass P290 ein geeigneter Vorläufer für Mip-spezifische Peptidinhibitoren darstellt.



**Abb. 32: Computermodell des Mip-P290-Komplexes.** Ergebnisse aus NMR-Messungen mit  $^{15}\text{N}$ -markiertem rekombinantem Mip und paramagnetisch markiertem P290 wurden für die Erstellung eines Computer-basierten Modells verwendet. Die PPIase-Domäne des Mip-Proteins ist in blauer raumfüllender Struktur, P290 als Stäbchenmodell mit den Seitenketten dargestellt. P290 ist zusätzlich farbkodiert (gelb bis rot). Die Farbkodierung basiert auf einer 18 ns langen Moleküldynamiksimulation, mit der die Stabilität des Komplexes überprüft wurde. Das Peptid ist über den simulierten Zeitraum stabil (gelb bis orange) mit der PPIase-Tasche assoziiert. Lediglich die N- und C-terminalen Seitenketten weisen größere Bewegungen (rot) auf.

Eine interessante Beobachtung, die im Zuge der Suche nach einer möglichen Bindungssequenz von Mip in Collagen IV gemacht wurde, war, dass die meisten putativen Sequenzen sich in der C-terminalen nicht-collagenösen Domäne (NC1) von Collagen IV  $\alpha 1$  befanden. Diese Domäne ist im Gegensatz zur zentralen Trippelhelix nicht in erster Linie für die Stabilisierung der Struktur zuständig, sondern für intermolekulare Interaktionen mit anderen Collagenmolekülen und mit Oberflächenrezeptoren der Epithelzellen, wie z.B. den Integrinen [Khoshnoodi et al., 2008]. Die NC1-Domäne kann zudem in drei weitere Regionen unterteilt werden (Abb. 33). Die N-terminale Region (ca. 50 Aminosäuren) ist für die Trimerisierung der Collagenfibrillen verantwortlich. Darauf folgt eine Gelenkregion (ca. 70 AS), die häufig Ziel von Matrixmetalloproteinasen oder Serinproteasen wie Elastase ist. Am C-terminalen Ende liegt die Rezeptorerkennungsregion (ca. 180 AS), die für die Interaktion mit anderen Molekülen zuständig ist.



**Abb. 33: Schematische Darstellung der einzelnen Regionen der NC1-Domäne.** Blau hinterlegt ist die Trimerisierungsregion, von der aus die Collagenmoleküle beginnen, sich umeinander zu winden. Pink unterlegt ist eine Gelenkregion, in der Erkennungssequenzen für Matrixmetallproteinasen wie MMP2 und MMP9 oder Serinproteasen wie Elastase vorliegen. Am C-terminalen Ende liegt die Rezeptorbindedomäne, die für Interaktionen mit anderen Collagenen oder Integrinen auf der Zelloberfläche verantwortlich ist.

Die Lage von P290 ist im Zusammenhang der NC1-Domäne recht interessant, da sie im Übergangsbereich der Gelenk- und der Rezeptorbinderegion liegt. Studien belegen, dass Mip bzw. die PPIase-Aktivität von Mip neben der Bindung an Collagen IV auch zu einem proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix beiträgt, was auch durch Beobachtungen in der Lunge infizierter Meerschweinchen bestätigt wird [Wagner *et al.*, 2007]. Diese proteolytische Aktivität trägt womöglich neben der Zerstörung des Lungenepithels auch der Verteilung der Bakterien im Organismus bei, einem Vorgang, der auch als „bakterielle Metastase“ bezeichnet wird [Lähteenmäki *et al.* 2005]. Dieser Vorgang kann *in vitro* in einem Transwell-System imitiert werden. In diesem Modell konnte die Teilnahme von Mip an der Transmigration von *L. pneumophila* über eine ECM beinhaltende intakte Epithelbarriere gezeigt werden [Wagner *et al.*, 2007]. Analog zu diesen Versuchen durchgeführte Transwell-Experimente zeigten, dass die Zugabe von 35  $\mu$ M P290 in der Lage waren, die Transmigration von Wildtyp *L. pneumophila* auf ein Niveau der Mip-defizienten Mutante bzw. mit Rapamycin behandelten Wildtyp Bakterien zu reduzieren.

Im Zusammenhang der bakteriellen Transmigration, an der mindestens noch eine unbekannte Serinprotease beteiligt sein muss [Wagner *et al.*, 2007],

konnte die Funktion der Bindung von Mip an Collagen IV nicht eindeutig geklärt werden. Ebenso ist nicht bekannt, ob die Bindung von Mip an die P290-Sequenz in Collagen IV zu einer Isomerisierung führt, die z.B. eine weitere Sequenz in der unmittelbaren Umgebung, also in der Gelenkregion, für den Angriff von Proteasen freigibt. Dies würde die Mip-abhängige Proteolyse sehr gut erklären. Dennoch suggerieren die derzeitigen Erkenntnisse der aus NMR-Messungen abgeleiteten Computersimulationen, dass der Mip-Collagen IV-Komplex erstens recht stabil ist, da eine 40 ns-Simulation keine Dissoziation der beiden Proteine ergab, und zweitens keine großen strukturellen Änderungen in der NC1-Domäne zu erwarten sind (Kai Schwedhelm, persönliche Mitteilung). Dies liegt möglicherweise daran, dass die NC1-Domäne durch mehrere Disulfidbrücken ihre stabile globuläre Struktur erhält. An einen von diesen Disulfidbrücken ist auch P290 beteiligt. Dies legt nahe, dass Mip während der Interaktion der Bakterien mit der ECM des Wirtes eine akzessorische Funktion erfüllt. Dadurch wird wahrscheinlich die Rekrutierung weiterer Virulenzfaktoren wie z.B. bakterieller Proteasen zu ihren Substraten in der ECM begünstigt. Ob Mip dabei auch eine zusätzliche Chaperone-ähnliche Funktion übernimmt und für die Aktivierung einzelner Virulenzfaktoren zuständig ist, ist eine zu klärende Fragestellung.

## 2. *Dictyostelium discoideum* als Wirtsmodellorganismus

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die praktischen Vorteile von *D. discoideum*, wie einfache Kultivierbarkeit, eine große Auswahl an Deletionsmutanten sowie das Vorhandensein eines cDNA-Microarrays genutzt, um unterschiedliche Aspekte der *Legionella*- und *Mycobacterium*-Infektion zu untersuchen.

Im Zusammenhang der *Legionella*-Infektion wurden einfache Deletionsmutanten unterschiedlicher zellulärer Prozesse im Rahmen des Infektionsverlaufs charakterisiert. Dies wurde mit dem Ziel durchgeführt, einzelne genetische Faktoren zu identifizieren, die während der *Legionella*-Infektion eine Rolle spielen könnten. Zudem wurde der Einfluss von Eisenchelatoren und der Manipulation des pHs auf den Verlauf der Infektion untersucht. Im Zusammenhang der *Mycobacterium*-Infektion wurden Transkriptomanalysen von infizierten Dictyostelien durchgeführt.

### 2.1 Studien mit Deletionsmutanten

Auf der Suche nach infektionsrelevanten Wirtsdeterminanten der Legionellose wurden unterschiedliche bereits beschriebene Deletionsmutanten verwendet. Die ausgewählten genetischen Determinanten waren Vertreter der Aktinzytoskelett-assoziierten Proteine, des Vesikeltransports, der kleinen GTPasen und des Phosphoinositolmetabolismus in Infektionsstudien charakterisiert.

#### 2.1.1 Das Aktinzytoskelett und kleine GTPasen

##### - Cyclase-assoziiertes Protein (CAP)

Das Aktinzytoskelett spielt eine zentrale Rolle in der *Legionella*-Infektion beginnend mit der Aufnahme der Bakterien [Coxon *et al.*, 1998, Lu und Clarke, 2005]. Infektionsstudien mit einer CAP-Unterexpressionsmutante unterstützten die Rolle des Aktinzytoskeletts dahingehend, dass diese Mutante eine deutliche Defizienz in der Aufnahme der Bakterien aufwies, und die aufgenommenen Bakterien sich in den ersten 48 h der Infektion viel schlechter als im Wildtyp vermehren konnten. CAP ist ein Adenylatcyclase-assoziiertes Protein, das auch an F-Actin binden und somit das Aktungleichgewicht beeinflussen kann [Sultana

*et al.*, 2005]. Zudem hat eine neuere Studie CAP als einen wichtigen Bestandteil von Signalwegen identifiziert, die das Aktinzytoskelett organisieren [Sultana *et al.*, 2009]. Eine genauere Untersuchung der Infektionsvorgänge in der CAP-Unterexpressionsmutante mit Hilfe von lichtmikroskopischen Methoden wäre daher eine wichtige Ergänzung zu den bis jetzt durchgeführten Studien, um die genaue Rolle von CAP in der *Legionella*-Infektion zu bestimmen.

## **- Coronin 7**

Coronin 1 ist einer der ersten in *Dictyostelium* identifizierten Wirtsfaktoren, der für die Vermehrung von *L. pneumophila* wichtig ist. Coronin 1-defiziente Dictyostelien sind permissiver gegenüber *L. pneumophila* [Solomon *et al.*, 2000]. Wie mikroskopische Studien zeigten, akkumuliert Coronin 1 nur in der Aufnahmephase am Phagosom von virulenten Legionellen, wonach es schnell wieder dissoziiert [Lu und Clarke, 2005]. In Maus-M $\Phi$  konnten diese Beobachtungen bestätigt und um die Erkenntnis erweitert werden, dass bei toten Legionellen diese Assoziation länger andauerte, und somit dem Abbau der Bakterien beitrug [Hayashi *et al.*, 2008]. Coronin 7 ist ein bis jetzt weniger untersuchtes Coronin, das sowohl im Menschen als auch in Dictyostelien vorkommt. Es wird vermutet, dass es durch eine Gen-Duplikation entstanden ist, da es von seinem Aufbau her einem doppelten Coronin 1 entspricht [Shina und Noegel, 2008]. Infektionsstudien mit Coronin 7-defizienten Dictyostelien zeigten den überraschenden Effekt, dass die Aufnahme der Bakterien deutlich zunahm. In anderen Phagozytose-Versuchen mit *E. coli* war der umgekehrte Effekt zu sehen (Maria Shina, persönliche Mitteilung). Die in der Coronin 7 beobachtete hohe Anzahl an intrazellulären Legionellen 3 h nach Beginn der Infektion ist womöglich auf eine erhöhte Aufnahmerate der Bakterien zurückzuführen, und nicht auf eine geringere Tötungsrate der aufgenommenen Bakterien. Dafür spricht, dass sich auch bei einer kurzen Infektionszeit von 15 min dasselbe Verhältnis zwischen der  $\Delta crn7$ -Mutante und dem Wildtyp einstellte und die Überexpression von Coronin 7 als ein GFP-Fusionsprotein den genau umgekehrten Effekt herbeiführte. Die Vermehrungsrate in den ersten 48 h nach der initialen Aufnahme hingegen war sowohl in der Deletionsmutante als auch im Wildtyp vergleichbar, sodass angenommen werden kann, dass Coronin

7 für die Vermehrung der Bakterien oder deren Eindämmung durch Wirtsabwehrmechanismen keinen Einfluss hat. Lichtmikroskopische Untersuchungen mit einer GFP-Crn7-Überexpressionsmutante zeigten, dass Coronin 7 sehr stark in den Filopodien und Pseudopodien von *D. discoideum* vorkommt. Es konnte jedoch keine eindeutige Kollokalisierung mit Rhodamin-gefärbten Legionellen beobachtet werden. Zusammen mit der beobachteten Zunahme in der Aufnahme beim Fehlen von Coronin 7 lässt vermuten, dass Coronin 7 gewissermaßen ein negativer Regulator der *Legionella*-Aufnahme ist. Die Aufnahme von *L. pneumophila* läuft eher in Form einer Macropinozytose als der klassischen Phagozytose ab [Watarai *et al.*, 2001]. Dies könnte auch den beobachteten Unterschied zu *E. coli* erklären, wo das Fehlen von Coronin 7 die Aufnahmefähigkeit durch Phagozytose verringerte. Die genaue Beteiligung von Coronin 7 sollte mit detaillierten mikroskopischen Studien unterstützt werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Lokalisation von Coronin 7 während der Infektion im Wildtyp. Dafür könnten spezifische Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen verwendet werden. Außerdem wäre auch die Lokalisierung von Coronin 7 in Coronin 1-defizienten Mutanten von Interesse. Denn in der Doppelmutante entsprach die Aufnahmerate von *L. pneumophila* der des Wildtyps bzw. der  $\Delta crn1$ -Mutante. Womöglich übernehmen beide Proteine in Aufnahmeprozessen regulatorische Funktionen, durch die sie ihre Lokalisierung in der Zelle gegenseitig beeinflussen. Dies hat dann zur Folge, dass ein Aufnahmeprozess entweder durch Phagozytose (Coronin 1) oder durch Makropinozytose (Coronin 7) stattfindet.

### – RacH

Kleine GTPasen, zu denen RacH gehört, sind wichtige molekulare Schalter, die in vielen zellulären Prozessen wie Endozytose, Vesikelverkehr oder Zytoskelettorganisation regulatorische Aufgaben übernehmen. Sie werden durch das Binden von GTP aktiviert und gehen in ihren inaktiven Zustand über, sobald sie mit Hilfe eines aktivierenden Proteins das gebundene GTP zu GDP hydrolysieren [Jaffe und Hall, 2005]. Von *L. pneumophila* ist bekannt, dass sie die Lokalisation und Aktivierung von wirtseigenen GTPasen wie Rab1, ARF1 und Sar1 mit Hilfe von Dot/Icm-sekretierten Effektoren aktiv beeinflussen

können [Nagai *et al.*, 2002, Kagan *et al.*, 2004, Brumell und Scidmore, 2007] (s.a. Abb. 2).

Die Deletion der kleinen GTPase RacH führte in *Dictyostelium* zu Störungen im endosomalen Verkehr und zu einer fehlerhaften Ansäuerung der frühen Endosomen. Da RacH die Aktinpolymerisation beeinflussen konnte, wurde angenommen, dass diese GTPase an Vesikeltransportprozessen beteiligt ist, die Aktin-abhängig ablaufen [Somesh *et al.*, 2006]. Zudem konnte mit *M. marinum* gezeigt werden, dass das Fehlen von RacH zu einer besseren Vermehrung der Bakterien führte [Hagedorn und Soldati, 2007]. Die Infektionsstudien mit *L. pneumophila* ergaben einen ähnlichen Phänotyp. Obwohl die Aufnahme nicht wesentlich gestört war, konnten sich die Bakterien in der Deletionsmutante in den ersten 48 h ca. 4-fach besser vermehren. Womöglich ist die gestörte Ansäuerung der Phagosomen der Grund dafür, dass aufgenommene Legionellen besser überleben und sich somit besser in der Mutante etablieren können. RacH ist somit eine Wirtsdeterminante, die sowohl in der *Legionella*- als auch in der *Mycobacterium*-Infektion von Bedeutung ist.

### 2.1.2 Vesikeltransport, Autophagie und der PI-Metabolismus

#### - LvsB

Als ein intrazellulärer Pathogen, der in einem membranumschlossenen Kompartiment vorkommt, muss *L. pneumophila* in einer sehr effektiven Art und Weise in den endosomalen Verkehr seiner Wirtszelle eingreifen. Unter diesem Aspekt stellten genetische Determinanten des Vesikeltransports einen besonderen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Eine solche Determinante ist das Gen *lvsB* (large volume sphere), das in mit virulenten Legionellen infizierten Dictyostelien ruterreguliert wird [Farbrother *et al.*, 2006]. *lvsB* ist das nächste Orthologe des humanen *lyst*-Gens (**l**ysosomal **t**rafficking regulator), das mit der genetischen Krankheit Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) assoziiert ist. CHS-Patienten leiden an häufig wiederkehrenden Infektionen, da ihre Lymphozyten wegen eines gestörten endosomalen Verkehrs große lysosomale Vesikel bilden und normale sekretorische Vorgänge nicht mehr erfüllen können [Ward *et al.*, 2000]. Die Untersuchung einer *lvsB*-defizienten Mutante hat einen ähnlichen

zellulären Phänotyp mit vergrößerten angesäuerten Vesikeln ergeben, aber eine Auswirkung auf die Abwehr von Pathogenen war noch nicht untersucht [Harris *et al.*, 2002].

Die Charakterisierung der  $\Delta lvsB$ -Mutante in *Legionella*-Infektionen ergab, dass die Aufnahme der Bakterien ca. 40 % schlechter stattfand und, dass sich die aufgenommenen Bakterien in den ersten 24 h deutlich schlechter vermehren konnten als im Wildtyp. Eigentlich würde die Repression von *lvsB* durch virulente Legionellen vermuten lassen, dass die Deletion des Gens keinen großen Einfluss auf die Vermehrung der Bakterien haben sollte, da sie einer transkriptionellen Stilllegung gleichkommt. Dennoch hat das Fehlen von *LvsB* einen negativen Effekt auf die Vermehrung von *L. pneumophila*. Womöglich ist die Repression des Gens nur bis zu einem gewissen Grad erforderlich, sodass eine Restaktivität für den Vesikeltransport notwendige Prozesse aufrechterhält und den Legionellen die effiziente Vermehrung ermöglicht.

Mit *Nramp1* und in Mäusen *Naip5* sind bereits zwei genetische Determinanten bekannt, die Resistenz gegenüber *L. pneumophila* vermitteln. Ob das humane *LYST*-Protein eine ähnliche Determinante ist, ist noch nicht bekannt. Jedoch deuten die ersten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf eine mögliche Rolle hin. Ob diese Ergebnisse auf die Infektion des Menschen übertragbar sind, könnte mit Hilfe von Zell-Kultur-Infektionen getestet werden, in denen das humane *LYST*-Gen mit Hilfe von RNA-Interferenz reprimiert wird. Zudem wäre von Interesse, eine Überexpression des Gens im Rahmen der Infektion zu analysieren, da es womöglich als ein Regulator der lysosomalen Biogenese die Abwehr von Eindringlingen unterstützen könnte.

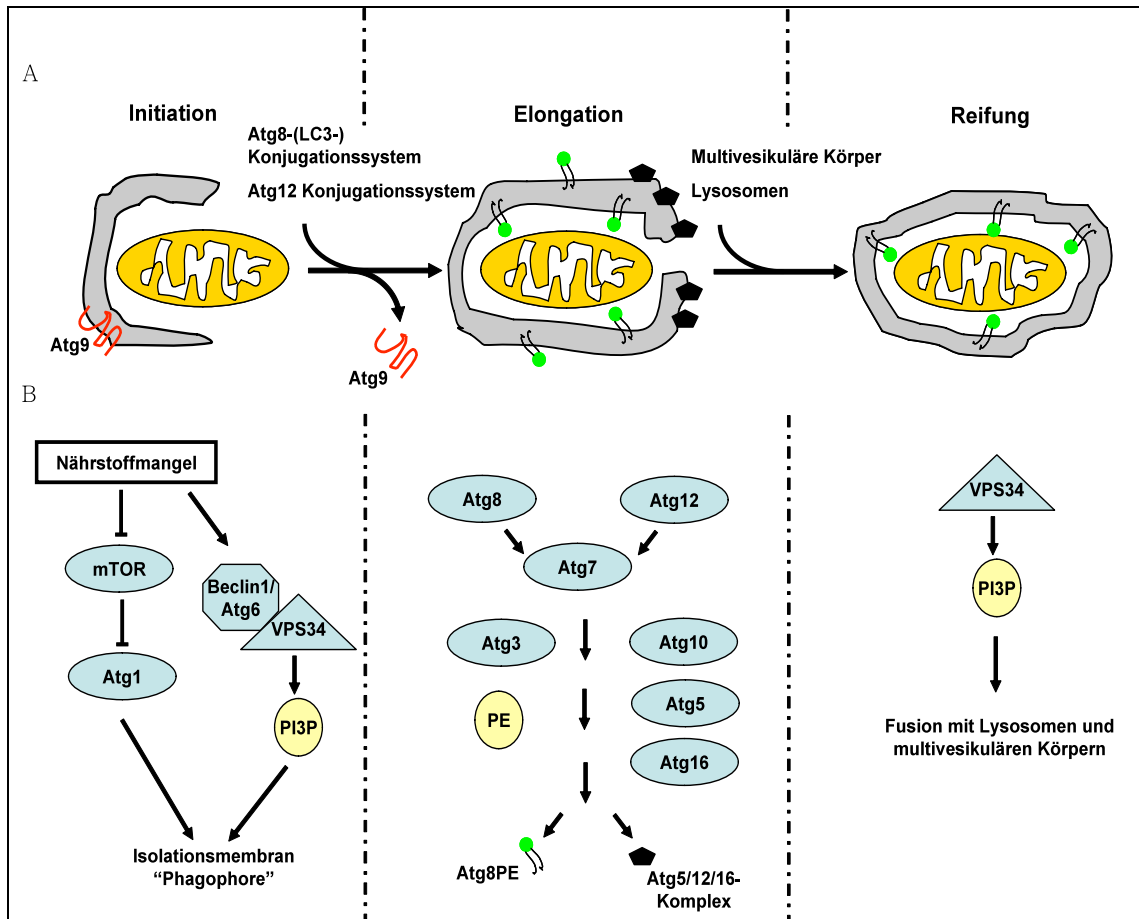
### **– Atg9 und Autophagie**

Autophagie ist ein wichtiger zellulärer Prozess, der in erster Linie dem Erhalt der Homöostase dient. Dies trifft für den Abbau größerer Proteinkomplexe (Mikroautophagie) sowie ganzer Organellen (Makroautophagie) zu, die nicht durch das Proteasomsystem entfernt werden können. Aber auch unter Nährstoffmangel kann Autophagie ausgelöst werden und das Überleben der Zelle über einen gewissen Zeitraum gewährleisten [Shintani und Klionsky, 2004, Levine B., 2005]. Zudem wird der Autophagie eine wichtige Rolle während der



Vertebratenentwicklung zugeschrieben, da es der zellulären Remodellierung von Gewebe während der Embryogenese und der postnatalen Entwicklung beiträgt [Cecconi und Levine, 2008].

Das wichtigste Charakteristikum der Autophagie ist das Einschließen von Zytoplasma bzw. Organellen durch eine Lipiddoppelmembran (Phagophore), die sich im Laufe des Prozesses zu einem Autophagosom schließt (Abb. 34A). Dieser Prozess, an dem 27 Atg- (**A**utophagy related protein) sowie viele weitere Proteine beteiligt sind, kann grob in drei Abschnitte unterteilt werden. In der Initiationsphase entsteht unter dem Einfluss von Atg1 und einem Komplex aus Atg6 und VPS34, der Phosphatidylinositol-3-Phosphat bildet, die Isolationsmembran (Phagophore). Gleichzeitig wird eine Rekrutierung von Atg9 von den Mitochondrien zur Phagophore beobachtet. Die Bildung des Autophagosoms wird primär durch die Kinase-Aktivität von TOR (**T**arget of **R**apamycin) kontrolliert. So lange diese aktiv ist, wird Atg1 phosphoryliert und bleibt inaktiv. Inhibition von TOR z.B. durch Nährstoffmangel verschiebt das Gleichgewicht hin zu nicht phosphoryliertem Atg1. In der Elongationsphase lagern sich Atg8 sowie ein Komplex aus Atg5, 12 und 16 an die Phagophore. Es wird vermutet, dass diese Proteine entweder durch *de novo* Synthese von Phospholipiden oder durch Rekrutierung vorhandener Lipidmembranen die Erweiterung der Isolationsmembran katalysieren. Zu diesem Zeitpunkt kann kein Atg9 mehr auf der Oberfläche des entstehenden Phagosoms nachgewiesen werden. In der Reifungsphase ist das Autophagosom geschlossen und alle Atg-Proteine bis auf die an der Innenseite vorhandenen Atg8-Moleküle dissoziieren von der Membran. Zudem fusioniert nun das Autophagosom mit multivesikulären Körpern und Lysosomen, die hydrolytische Enzyme liefern und den Abbau des eingeschlossenen Materials bewirken. Auch in dieser späten Phase spielt VPS 34, eine TypIII PI-3-Kinase eine wichtige Rolle (Abb. 34B).



**Abb. 34: Schematischer Überblick zur Autophagie.** (A) Autophagie kann in drei Abschnitte unterteilt werden. In ihrer Initiationsphase werden für den Abbau bestimmte Organelle oder Proteinkomplexe von einer Doppelmembran, der sogenannten Isolatmembran (Phagophore), umgeben. In dieser Phase wird auch eine Anreicherung von Atg9 auf der Phagophore beobachtet. Nach der Initiationsphase lagern sich mit Phosphatidylethanolamid (PE) konjugiertes Atg8 und der Atg12-Konjugationskomplex an die Phagophore. Dies führt die Elongationsphase ein, in der die Umschließung der Zielstruktur durch die Membran vollzogen wird. In dieser Phase liegt kein Atg9 mehr auf der Phagophore vor. Nach dem Einschluss werden alle außenständigen Atg-Proteine zurückgewonnen und das entstandene Autophagosom fusioniert mit Lysosomen und multivesikulären Körpern, die degradierende Enzyme liefern. (B) Zusammenfassung der grundlegenden genetischen Determinanten der Autophagie.

In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Pathogene zur Aktivierung von Autophagie führen können [Levine und Deretic, 2007, Mizushima *et al.*, 2008]. In den meisten Fällen ist Autophagie ein zusätzlicher Abwehrmechanismus gegen in Vakuolen vorliegende Invasoren, der gleichzeitig die Antigenpräsentation unterstützt [Vyas *et al.*, 2008]. So dämmt im Falle von *Toxoplasma gondii* und *Burkholderia pseudomallei* Autophagie die Infektion ein [Zhao *et al.*, 2007, Cullinane *et al.*, 2008]. Auf der anderen Seite gibt es auch intrazelluläre Pathogene wie z.B. *Porphyromonas gingivalis*, *Anaplasma*

*phagocytophilum* oder das humane Cytomegalovirus, die Autophagiemechanismen zu ihrem Vorteil ausnutzen und sich dadurch in ihrem Wirt etablieren können [Dorn *et al.*, 2001, Chaumorcet *et al.*, 2008, Niu *et al.*, 2008].

Welche Rolle Autophagie während der *Legionella*-Infektion spielt, ist nicht eindeutig geklärt. Zu diesem Thema gibt es zwei Veröffentlichungen, die zudem zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen kommen. In der ersten Studie wurden *Dictyostelium*-Mutanten, in denen jeweils *atg1*, 5, 6, 7 oder 8 deletiert waren, im Zusammenhang der *Legionella*-Infektion untersucht, und zeigten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem konnten die Autoren keine Co-lokalisierung von GFP-markiertem Atg8 mit *Legionella*-haltigen Vakuolen beobachten. Daraus wurde gefolgert, dass Autophagie für die Infektion von *D. discoideum* nicht von Bedeutung ist [Otto *et al.*, 2004]. Eine weitere Studie, in der Maus-M $\Phi$  verwendet wurden, und mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie Co-lokalisierung von Atg7 und Atg8 sowie Monodensylcadaverin mit *Legionella*-haltigen Vakuolen beobachtet wurde, belegte hingegen, dass diese Kompartimente Autophagosom-ähnliche Eigenschaften annehmen. Außerdem führte die Inhibition von Autophagie durch 3-Methyladenin zu einer deutlichen Abnahme der Zahl intrazellulär überlebender Bakterien [Amer *et al.*, 2005]. Studien mit Maus-M $\Phi$  zufolge, ist die Funktion von Autophagie in der *Legionella*-Infektion, weder eindeutig als Abwehrmechanismus noch eindeutig als von den Legionellen durch sekretierte Effektoren stimulierter Vorgang zu betrachten. In M $\Phi$  der *Legionella*-anfälligen A/J-Mäuse scheint die Reifung des Phagosoms dem eines Autophagosoms zu gleichen und der Vermehrung beizutragen [Amer *et al.*, 2005]. Es wurde sogar ein im Überstand vorhandener Autophagie-stimulierender Faktor (ASF) postuliert, der eine langsame Autophagosom-ähnliche Biogenese des *Legionella*-haltigen Phagosoms und die anschließende bakterielle Replikation ermöglicht. In M $\Phi$  der *Legionella*-resistenten C57Bl/6-Mäusen, scheint hingegen das Phagosom viel schneller in ein Autophagosom ummodelliert zu werden und eine zusätzliche Abwehr gegen die Pathogene zu ermöglichen [Amer *et al.*, 2005, Dubuisson und Swanson, 2006].

Dass Autophagie auch in *Dictyostelium* eine infektionsrelevante Funktion haben könnte, legten Transkriptomanalysen von mit *L. pneumophila* infizierten Dictyostelien nahe. 24 h nach Infektionsbeginn wurden drei Autophagiegene differentiell reguliert. Und zwar wurde *atg9* hochreguliert, während *atg8* und *atg16* reprimiert wurden [Farbrother *et al.*, 2006]. Die Anreicherung Autophagie-assoziiierter Gene während der Infektion zusammen mit der differentiellen Expression, waren ausschlaggebend dafür, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Atg9-deffiziente Mutante in *D. discoideum* generiert und im Zusammenhang der *Legionella*-Infektion untersucht wurde. In Infektionsstudien zeigte sich, dass die Atg9-deffiziente Mutante eine deutlich geringere Aufnahme rate als der Wildtyp aufwies. Der für die Infektion typische Rückgang der Zahl intrazellulärer Bakterien in den ersten 28 h der Infektion war jedoch im Falle der Mutante deutlich geringer und die Vermehrung fing früher an. Über einen langen Zeitraum betrachtet, verschwand aber dieser Effekt, womöglich weil nach dem ersten Infektionszyklus der Aufnahmedefekt der Mutante die bessere Vermehrung in den folgenden Infektionszyklen neutralisierte. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den *Legionella*-haltigen Vakuolen des Wildtyps und der Atg9-Mutante aufweisen. Dennoch wurden 24 h nach Infektionsbeginn im Wildtyp mehrere geschlossene Doppelmembraneinschlüsse detektiert, während in der Mutante diese fehlten. Jedoch müssen diese elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Hilfe von quantitativen Messungen überprüft werden.

Die Studien mit der *atg9*-k.o.-Mutante können, obwohl sie noch grundlegende Fragen offen lassen, als ein Indiz dafür bewertet werden, dass die Rolle der Autophagie in *Dictyostelium* nicht wie von Otto *et al.* suggeriert als eindeutig irrelevant abgetan werden sollte. Es ist vielmehr eine differentielle Herangehensweise an dieses Thema im Rahmen der *Legionella*-Infektion notwendig. Womöglich sind nicht der gesamte Prozess der Makroautophagie sondern Teile der Autophagiemaschinerie für die Infektion von Bedeutung. So ist bemerkenswert, dass laut Transkriptomstudien *atg9*, ein für die Initiationsphase typisches Protein hochreguliert wird, während zwei Kernkomponenten der Elongationsphase, nämlich *atg8* und *atg16*, runterreguliert werden [Farbrother *et al.*, 2006]. Atg16 ist für die Lokalisation

des Atg5/12-Komplexes zur Isolationsmembran verantwortlich. Zusammen mit Atg8, das mit Hilfe von Phosphatidylethanolamin zur Phagophore lokalisiert, tragen sie der Erweiterung der Membran und somit der Umschließung des abzubauenen Materials bei [Kuma *et al.*, 2002, Mizushima *et al.*, 2003a & b, Xie *et al.*, 2008]. Atg9 auf der anderen Seite kommt nur in der Initiationsphase auf der Isolationsmembran vor und dissoziiert von dieser mit dem Eintritt in die Elongationsphase [Noda *et al.*, 2000, Mari und Reggiori, 2007a & b]. Atg9 ist neben Atg27 das einzige Transmembranprotein, das an der Initiationsphase der Autophagie teilnimmt [Yen und Klionsky, 2007]. Atg9 und Atg27 kommen jedoch in unterschiedlichen Reservoirs in der Zelle vor, von denen aus sie zur Isolationsmembran rekrutiert werden. Während Atg27 vom Golgiapparat rekrutiert wird, kommt Atg9 im Ruhezustand auf Mitochondrien vor [Legakis *et al.*, 2007]. Die frühe Assoziation des *Legionella*-haltigen Phagosoms mit Mitochondrien ist ein Charakteristikum der Infektion [Horwitz, 1983]. Wie es zu dieser Assoziation kommt, die durch virulente Legionellen induziert wird und womöglich für die Vermehrung der Bakterien wichtig ist, ist unbekannt. Dass aber Atg9 ein mögliches Brückenglied in der Rekrutierung der Mitochondrien sein könnte, ist eher unwahrscheinlich. Denn in diesem Fall würde das Fehlen von Atg9 eher einen Nachteil für intrazelluläre Legionellen darstellen, als dass sie sich besser als im Wildtyp vermehren könnten. Dennoch ist die Rekrutierung von Mitochondrien zum *Legionella*-haltigen Phagosom in der Atg9-defizienten Mutante eine interessante Fragestellung, die durch intensive elektronenmikroskopische Studien, lichtmikroskopische Lebendaufnahmen sowie Immunfluoreszenzanalysen erläutert werden kann.

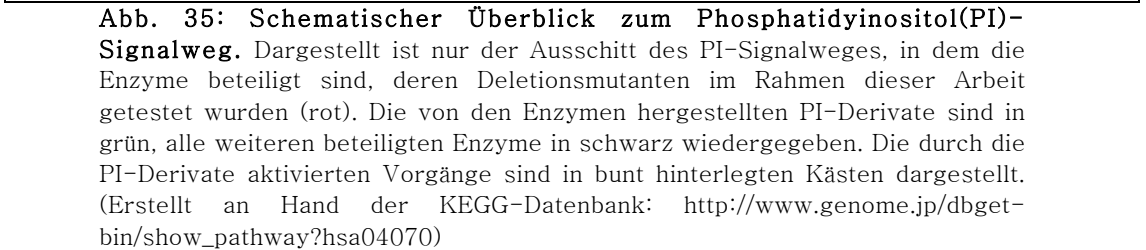
Abgesehen von der mitochondrialen Lokalisation ist die Beteiligung von Atg9 an der Autophagie im Rahmen einer Abwehrreaktion der Wirtszelle der wohl wahrscheinlichere Aspekt. Dies könnte der Grund für die Hochregulation von *atg9* 24 h nach Infektionsbeginn sein. Während die Runterregulation von *atg8* und *atg16* durchaus ein von *L. pneumophila* gesteuerter Vorgang sein kann, der gegen eine mögliche Abwehrreaktion des Wirtes gerichtet ist. Obwohl von *L. pneumophila* noch kein Dot/Icm-Substrat bekannt ist, das aktiv in die Transkriptionsvorgänge des Wirtes eingreift, gibt es klare Hinweise dafür, dass in MΦ eine Dot/Icm-abhängige Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade

stattfindet. Dadurch werden anti-apoptotische Transkriptionsvorgänge in Gang gesetzt und ein frühzeitiges Absterben der Wirtszelle verhindert [Losick und Isberg, 2006, Abu-Zant *et al.*, 2007]. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt gleichzeitig zur Unterdrückung der Autophagie in humanen Zell-Linien [Djavaheri-Mergny *et al.*, 2006, Xiao, 2007]. Umgekehrt kann der Abbau der I- $\kappa$ B-Kinase durch Autophagie zur Inaktivierung von NF- $\kappa$ B und den untergeordneten Signalwegen führen und zeigt, wie beide Vorgänge ineinander verwickelt sind [Qing *et al.*, 2006]. Obwohl die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade als für Metazoen typisch betrachtet wird, gibt es Hinweise dafür, dass *Dictyostelium* NF- $\kappa$ B-ähnliche Signaltransduktionssysteme besitzt [Traincard *et al.*, 1999]. Die genaue molekulare Wechselwirkung von *L. pneumophila* mit diesen Wirtsprozessen ist ein völlig unbekanntes und höchst spannendes Gebiet, für das sich *D. discoideum* als geeignetes Wirtsmodellsystems anbietet.

Neben den Signalwegen, die zu einer differentiellen Autophagieantwort in *Dictyostelium* führen, wäre auch der Einfluss weiterer Autophagiegene der Initiationsphase von Interesse. Die Rekrutierung von Atg9 zur Isolationsmembran erfolgt je nach Bedingung unter der Mitwirkung von Atg11 oder Atg17 [He *et al.*, 2006, Sekito *et al.*, 2009]. Die Herstellung und Untersuchung von *atg9/atg11*- bzw. *atg9/atg17*-Doppeldeletionsmutanten könnte in dieser Hinsicht eine wichtige Ergänzung darstellen. Zur Unterstützung der Hypothese einer *Legionella*-induzierten Unterdrückung der Autophagie könnten Mutanten untersucht werden, die *atg8* und *atg16* überexprimieren.

### **- Phosphatidylinositol-Metabolismus und Autophagie**

Weitere Hinweise dafür, dass Autophagie für die *Legionella*-Infektion in *Dictyostelium* von Bedeutung ist, können aus den Untersuchungen mit den Mutanten des Phosphatidylinositolmetabolismus gewonnen werden. Der PI-Metabolismus und PI-Signalweg spielen eine zentrale Rolle in vielen zellulären Vorgängen als Lieferanten von diversen PI-derivaten, da diese Secondmessenger in vielen weiteren Signalwegen sind. Diese Signalwege beeinflussen ihrerseits unter anderem die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und den endosomalen Verkehr sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalkaskaden, die unter anderem die Autophagie betreffende Vorgänge regulieren können (Abb. 35).



Von *L. pneumophila* sind zwei Dot/Icm-Substrate (SidM und SidC) bekannt, die PI4-Phosphat binden und es zum *Legionella*-haltigen Phagosom rekrutieren können. Dieser Vorgang unterstützt die Assoziation des Phagosoms mit Vesikeln, die vom ER der Wirtszelle stammen [Ragaz *et al.*, 2008, Brombacher *et al.*, 2009]. Zusätzlich konnte auch mit Hilfe von *Dictyostelium* der Einfluss von zwei Wirtsfaktoren des PI-Signalweges auf die intrazelluläre Replikation von *L.*

*pneumophila* beschrieben werden. Demzufolge tragen Klasse-I-PI3-Kinasen zum Abbau von aufgenommenen avirulenten Legionellen bei, während bei Abwesenheit der Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase die Vermehrung von virulenten Legionellen besser abläuft [Weber *et al.*, 2006 und 2009]. In Transkriptomstudien von *D. discoideum* waren eine Diacylglycerol (DAG) abhängige PI4-Phosphat-5-Kinase (*pipkinA*) 24 h bzw. eine Phospholipase C (*pipA*) 3 h nach Infektionsbeginn hochreguliert, somit interessante Kandidaten für Infektionsstudien [Farbrother *et al.* 2006]. Zusätzlich zu diesen beiden Mutanten wurden auch eine *pldB*- sowie eine *iplA*-negative Mutante getestet (s.a. Abb. 35). In Invasions- und Infektionsexperimenten konnte bis auf die  $\Delta pipA$ -Mutante eine Abnahme in der Zahl der aufgenommenen Bakterien beobachtet werden. In zwei von diesen, nämlich  $\Delta pldB$  und  $\Delta iplA$ , hingegen konnten sich die Bakterien in den ersten 48 h besser vermehren als im Wildtyp. Die bessere Aufnahme in der  $\Delta pipA$ - und die schlechtere in der  $\Delta pipkinA$ -Mutante hatten jedoch keinen erkennbaren Effekt auf die intrazelluläre Vermehrung (Abb. 36).

Deletion	Aufnahme	Replikationsrate
<b>Phospholipase C</b>	↑	↔
<b>Phospholipase D</b>	↓	↑
<b>Klasse-I-PI3-Kinasen</b> (Weber <i>et al.</i> , 2006)	↔	↑
<b>IP3-Rezeptor (IplA)</b>	↓	↑
<b>PipkinA</b>	↓	↔

Abb. 36: Graphische Darstellung der Auswirkung einzelner Deletionen im PI-Metabolismus auf die Aufnahme und Vermehrung von *L. pneumophila*. Die in dieser Arbeit mit Hilfe von Invasions- und Infektionsexperimenten getesteten *Dictyostelium*-Deletionsmutanten sind aufgelistet. Grüner Pfeil: besser als im Wildtyp, roter Pfeil: schlechter als im Wildtyp, gelber Pfeil: kein Unterschied. Die Klasse-I-PI3-Kinasen wurden vollständigshalber mit aufgeführt (Quelle Weber *et al.*, 2006).



Phospholipasen der Klasse D sind eine mögliche Quelle für Phosphatidylethanolamin (PE), und können somit an Atg8-abhängigen Prozessen beteiligt sein. Für IplA (Inositol(1,4,5)*tris*-Phosphat Rezeptor) konnte gezeigt werden, dass es in *Dictyostelium* an einer Autophagie auslösenden Signalkaskade beteiligt ist [Lam *et al.*, 2008, Lam und Golstein 2008]. Dass der Verlust dieser beiden Gene, zu einer besseren Vermehrung intrazellulärer Bakterien führt, könnte ein Hinweis dafür sein, dass Autophagie bzw. Autophagie-abhängige Prozesse eine gewisse Rolle während der Abwehr von *L. pneumophila* in *D. discoideum* spielen. Umgekehrt ist auch durchaus denkbar, dass *Legionella* zumindestens Teile der Autophagie z.B. als eine mögliche Membranquelle für die Erweiterung des Phagosoms während der Replikation oder einen Lieferanten von abbaubaren Proteinkomplexen aus dem Wirt als Aminosäurequelle ausnutzt.

## 2.2 Transkriptomanalysen zur *Mycobacterium marinum*- Infektion in *Dictyostelium discoideum*

Transkriptomanalysen mit Hilfe von Microarrays ermöglichen den Einfluss einzelner Faktoren auf die gesamte transkriptionelle Aktivität eines Organismus zu untersuchen. Sie erlauben somit einen sehr umfangreichen Überblick darüber, wie Organismen auf Veränderungen reagieren. Eine solche Änderung kann auch eine Infektion darstellen. Das Vorhandensein einer annotierten Genomsequenz von *D. discoideum*, ermöglichte die Erstellung eines Microarrays, auf dem die Hälfte des Genoms repräsentiert ist. Mit Hilfe dieses Arrays wurden bereits wichtige Erkenntnisse bezüglich der transkriptionellen Antwort von Dictyostelien auf *L. pneumophila* gewonnen [Farbrother *et al.*, 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit war es von Interesse die Methode auf einen weiteren intrazellulären, gram-positiven Pathogenen zu übertragen und mit *L. pneumophila* zu vergleichen. Dafür wurde *M. marinum* ausgewählt, das nachgewiesener Weise in der Lage ist, *D. discoideum* zu infizieren [Solomon *et al.*, 2003].

*M. marinum* ist ein wichtiger Pathogen von Fischen, dessen Übertragung in Fischpopulationen und von diesen auf den Menschen durch die industrialisierte Fischzucht in Farmen stark begünstigt wird. Hinzu kommt, dass *M. marinum* laut 16S rRNA-Sequenzanalysen der nächste verwandte des *M. tuberculosis*-Komplexes ist [Tonjum *et al.*, 1998]. Die Granulome, die *M. marinum* in der Leber, Niere und Milz von Fischen verursacht, sind denen von *M. tuberculosis* in der Lunge von Menschen gebildeten sehr ähnlich [Stamm und Brown, 2004]. Außerdem haben beide Pathogene viele Virulenzfaktoren gemeinsam, die z.T. sogar zur Komplementation in der jeweils anderen Spezies verwendet werden können. So führte die Deletion von PE-PGRS-Proteinen sowohl in *M. marinum* als auch in *M. tuberculosis* zur Attenuation [Barker *et al.*, 1998, Ramakrishnan *et al.* 2000]. Beide Pathogene besitzen einen Locus, der für ein neuartiges Sekretionssystem kodiert, und für die frühe Translokation von ESAT-6 und CFP-10 in die Wirtszelle verantwortlich ist [Gao *et al.*, 2004]. Diese Gemeinsamkeiten zusammen mit den Vorzügen der einfacheren Kultivierung und des geringeren Infektionsrisikos für Menschen machen *M. marinum* zu einem

geeigneten Modellsystem für die Untersuchung der zellulären Biologie der Tuberkulose, der wichtigsten humanen bakteriellen Infektionskrankheit.

### 2.2.1 Vergleich von Infizierten Zellen und nicht infizierten Zellen

Für diese Studie wurde mRNA infizierter und nicht infizierter Dictyostelien zu unterschiedlichen Zeitpunkten über einen Gesamtzeitraum von 72 h aufbereitet, um eine zeitliche Auflösung des Transkriptoms der *M. marinum*-Infektion zu erzielen. Wie es sich herausstellte waren die meisten Gene 24 h nach Infektionsbeginn differentiell reguliert, was auch den Erfahrungen der *Legionella*-Infektion entspricht und vermuten lässt, dass im Modellsystem *Dictyostelium* die intensivsten Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen zu diesem Zeitpunkt stattfinden. Womöglich liegt das daran, dass in beiden Infektionen ab diesem Zeitpunkt ein Beginn der bakteriellen Replikation zu beobachten ist; also zu einem Zeitpunkt, zu dem sich die Pathogene in ihrem Wirt etabliert haben und beginnen seine Ressourcen für sich auszubeuten. Dies führt zu einer gewissen Abwehrreaktion seitens des Wirtes, die sich durch die Anreicherung von Genen der Homöostase, der Zellwand und Plasmamembran sowie der Synthese von Secondmessengern bemerkbar macht.

Auch eine rege Deregulation im Bereich des Vesikeltransports konnte 24 h nach Infektionsbeginn beobachtet werden. Zehn Prozent der zu diesem Zeitpunkt hochregulierten Gene gehörten dieser Gruppe an und waren die dritthäufigsten nach der Gruppe der Gene unbekannter Funktion (20 %) und der Gruppe der Lektine und Glykoproteine (10,83 %). Nachdem die Mykobakterien die Phagosomenreifung aufgehalten haben, liegen sie in einem frühen Endosom-ähnlichen Kompartiment vor. Zusätzlich können sie in ihren Wirtszellen innerhalb der Granulome für längere Zeit persistieren, ohne sich zu vermehren. Während dieser Persistenzphase erhalten sie den Zufuhr von Nährstoffen aufrecht, indem sie sich über noch unbekannte Mechanismen in das endosomale Netzwerk des Wirtes integrieren. Dadurch können sie Recyclingvesikel rekrutieren, die z.B. mit Eisen beladenes Ferritin beherbergen [Clemens und Horwitz, 1996, Philips, 2008]. In diesem Zusammenhang ist eine Hochregulation

von Genen des Vesikeltransports eine interessante Beobachtung, die Aufschlüsse über die molekularen Mechanismen dieser Vorgänge liefern könnte. Hinzu kommt, dass drei dieser Gene der SNF7-Familie angehören, die an der Rekrutierung von Membranproteinen vom Zytoplasma zu Endosomen und der weiteren Konzentration und Sortierung der entstehenden Komplexe beteiligt sind [Babst *et al.*, 2002]. In diesem Zusammenhang wäre denkbar, dass *M. marinum* die Nahrungsaufnahme von *Dictyostelium* aus der Umwelt durch rezeptorvermittelte Endozytose stimuliert und anschließend den Transport der aufgenommenen Nährstoffe ins Phagosom fördert. Das würde auch mit der beobachteten Hochregulation von Oberflächenrezeptoren wie Lektinen und Glykoproteinen übereinstimmen.

### 2.2.2 Vergleich der *L. pneumophila*- und der *M. marinum*-Infektion

Ein Vergleich der Expressionsdaten aus dieser Arbeit mit den bereits publizierten von *Legionella*-infizierten Dictyostelien zeigte, dass in beiden Infektionen 24 h nach Infektionsbeginn die meisten Gene dereguliert wurden. Unter diesen waren in beiden Infektionen 24 Gene hoch- bzw. 19 Gene runterreguliert. Interessanter Weise waren vier der gemeinsam hochregulierten Gene die bereits erwähnten Lektine bzw. Glykoproteine. Unter den runterregulierten Genen hatten beide Infektionen Atg16 gemeinsam. Dies ist in Hinblick auf die mögliche Rolle von Autophagie in der *Legionella*-Infektion von großem Interesse. Eine mögliche Pathogen-gesteuerte Runterregulierung der Expression von Autophagiegenen als eine Antwort auf die Wirtsabwehr wäre somit ein als generell zu betrachtender Prozess. Im Falle von *M. tuberculosis* ist bereits bekannt, dass die Bakterien in der Lage sind VPS34 mit Hilfe von LAM zu inhibieren. VPS34 ist eine Klasse-III-PI3-Kinase, die PI3P bildet und zusammen mit Atg6 in die Initiationsphase der Autophagie involviert ist (s.a. Abb. 33). Zudem kann das vorhandene PI3-Phosphat mit Hilfe einer sekretierten Phosphatase, SapM, zusätzlich abgebaut werden [Vergne *et al.*, 2003 & 2005, Purdy *et al.*, 2005]. Die zusätzliche Unterdrückung der Autophagie in der Elongationsphase würde somit den Abbau der Bakterien verhindern.

### 2.2.3 Vergleich der transkriptionellen Antwort von *D.*

#### *discoideum* auf die Infektion von *M. marinum* R93 und seiner $\Delta pmiA$ -Mutante

Um Gene zu identifizieren, die speziell während einer Infektion mit virulenten *M. marinum* reguliert werden, wurden die Transkriptomstudien mit einem anderen Wildtypstamm (*M. marinum* R93) und seiner attenuierten  $\Delta pmiA$ -Mutante wiederholt. *pmiA* wurde in einer Studie identifiziert, in der eine durch Transposonmutagenese hergestellte Bank an Deletionsmutanten von *M. m.* R93 in MΦ getestet wurde. Die  $\Delta pmiA$ -Mutante konnte die Ansäuerung des Phagosoms nicht verhindern und sich dementsprechend in den Zellen nicht vermehren [Robinson *et al.*, 2007].

Die Transkriptomstudien konzentrierten sich in diesem Fall auf den 24 h-Zeitpunkt, da zu diesem Zeitpunkt die meisten regulatorischen Aktivitäten beobachtet wurden. Dennoch gab es bezüglich der Ergebnisse einige Unterschiede zu den Infektionen mit dem zuvor verwendeten Wildtyp *M. marinum* DSM44750. Wenn nicht infizierte Zellen mit Zellen verglichen wurden, die mit dem Wildtyp R93 infiziert wurden, waren 73 Gene hoch- und 101 Gene runterreguliert. Dieses Verhältnis war in den Infektionen mit DSM44750 umgekehrt (155 hoch- und 61 runterreguliert). Daher wurden die Daten dieses Ansatzes in erster Linie für sich untersucht, und es wurden die Infektionen mit R93 und mit der  $\Delta pmiA$ -Mutante miteinander verglichen. Dieser Vergleich zeigte, dass 17 bzw. 16 Gene R93-spezifisch hoch- bzw. runterreguliert wurden. Jeweils 10 dieser waren auch in vergleichenden Infektionen mit virulenten und attenuierten *L. pneumophila* dereguliert, und nur je zwei aus jeder Gruppe wiesen einen entgegengesetzten Trend auf. Diese große Übereinstimmung der verändert regulierten Gene deutet darauf hin, dass beide Pathogene in ihrem Wirt ähnliche Vorgänge hervorrufen, obwohl sie über unterschiedliche Virulenzfaktoren verfügen. Unter den infektionsabhängig regulierten Genen sind Dynamin, eine GTPase die an Phagosomen lokalisiert, und Hsp20, ein Hitzeschock-Protein, von besonderer Interesse, da die Gene der beiden Proteine sowohl in virulenten *M. marinum* als auch in virulenten *L. pneumophila*

runterreguliert wurden. Diese könnten für die Unterbindung der Phagosomenreifung und der Wirtsabwehrmechanismen im Allgemeinen wichtige Prozesse steuern. Daher wären Studien mit Deletionsmutanten dieser Gene mit den beiden Pathogenen eine interessante Fortsetzung der Transkriptomdaten.

### 3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine spezifische Mip-Bindungssequenz innerhalb des humanen Collagen IV identifiziert werden, die sich in der NC1-Domäne befindet. Diese Sequenz (P290) könnte ein Vorläufer eines Peptidinhibitors sein, da P290 in die PPIase-aktive Domäne des Mip-Proteins bindet. Obwohl in Protease-gekoppelten PPIase-Assays ein inhibitorischer Effekt von P290 auf die enzymatische Aktivität von Mip gemessen wurde, sollten diese Messungen in einem Protease-freien Ansatz wiederholt werden. Dadurch würden mögliche Einflüsse von P290 auf die Protease ausgeschlossen. Im Falle einer Bestätigung der inhibitorischen Aktivität ist die Optimierung des Peptids durch Modifikationen von großem Interesse. Für die Optimierung des Peptids hin zu einem effektiven Inhibitor liefern die mittels NMR gewonnenen strukturellen Informationen zum Mip-P290-Komplex wichtige Hinweise. Unter den denkbaren Modifikationen befinden sich der Austausch von Aminosäuren, Veränderung der Peptidlänge, Zyklisierung und Derivatisierung der Aminosäurereste. Neben der Optimierung der inhibitorischen Kapazität von P290 sollten auch Maßnahmen zur Erhöhung der Löslichkeit des Peptids und der Stabilisierung im Serum durchgeführt werden. Hierfür ist die Verwendung von D-Aminosäuren als Bausteine oder die Modifikation des Peptidrückgrats z.B. durch Methylierungen denkbar.

Durch die Verwendung von *Dictyostelium*-Mutanten konnte *atg9* als ein infektionsrelevanter Wirtsfaktor identifiziert werden, der während der frühen Infektionsphase von Bedeutung ist. Die Rolle der Autophagie während der *Legionella*-Infektion in *Dictyostelium* könnte mit Hilfe von weiteren Deletionsmutanten detailliert untersucht werden. Dafür wären *atg11* und *atg17* mögliche Kandidaten, da deren Genprodukte an der Rekrutierung von Atg9 zur Phagophore beteiligt sind. Auch pharmakologische Studien mit 3-Methyladenin oder Rapamycin, die die Autophagie unterbinden bzw. induzieren, könnten Aufschlüsse über die Rolle der Autophagie liefern. Der IplA-Rezeptor ist an der Ausführung der Autophagie beteiligt. Als ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal des ERs ist IplA gleichzeitig ein wichtiger Induktor vieler  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter Signaltransduktionsvorgänge. Die Beziehung zwischen der Autophagie und ER-abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -

Signale könnte mit Hilfe von gezielten Deletionen von Genen genauer untersucht werden, deren Genprodukte an der Regulation dieses Kanals beteiligt sind.

In Microarray-Studien konnten Gene identifiziert werden, die in *D. discoideum* während einer Infektion mit *M. marinum* differentiell reguliert werden. Darunter waren Gene der SNF7-Familie häufig hochreguliert. Die Rolle dieser am Vesikeltransport beteiligten Faktoren könnte durch die gezielte Deletion im Detail analysiert werden. Zudem ermöglichen die Transkriptomsstudien auch die Identifikation von Wirtsfaktoren, die auch für die Infektion von Menschen von Bedeutung sind. Dies könnte durch den Einsatz der RNA-Interferenztechnologie in der Zellkultur untersucht werden. Diese Studien erlauben zudem den Vergleich von Infektionsvorgängen unterschiedlicher Pathogene und die Identifizierung von Wirtsfaktoren, die allgemein in Infektionen eine Rolle spielen bzw. für einen einzelnen Krankheitserreger spezifisch sind.



## VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abu-Zant A, Jones S, Asare R, Suttles J, Price C, Graham J, Kwaik YA (2007) Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell Microbiol* 9(1): 246–264
- Abu Kwaik Y (1996) The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol* 62(6): 2022–2028
- Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, Daneshvar MI, Pruckler JM, Ratcliff RM, Harrison TG, Weyant RS, Birtles RJ, Raoult D, Halablab MA (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 3): 1151–1160
- Aggett PJ, Cavanagh NP, Matthew DJ, Pincott JR, Sutcliffe J, Harries JT (1980) Shwachman's syndrome. A review of 21 cases. *Arch Dis Child* 55(5): 331–347
- Akermi M, Doleans A, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S (2006) Characterization of the *Legionella anisa* population structure by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 258(2): 204–207
- Alibaud L, Kohler T, Coudray A, Prigent-Combaret C, Bergeret E, Perrin J, Benghezal M, Reimann C, Gauthier Y, van Delden C, Attree I, Fauvarque MO, Cosson P (2008) *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes identified in a *Dictyostelium* host model. *Cell Microbiol* 10(3): 729–740
- Allard KA, Viswanathan VK, Cianciotto NP (2006) *lbtA* and *lbtB* are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J Bacteriol* 188(4): 1351–1363
- Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frere J (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* 57(5): 497–502
- Alli OA, Gao LY, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 68(11): 6431–6440
- Alli OA, Zink S, von Lackum NK, Abu-Kwaik Y (2003) Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. *Microbiology* 149(Pt 3): 631–641
- Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI (1994) *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179(2): 601–608

- Altman E, Segal G (2008) The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* *icm/dot* components as well as new translocated substrates. *J Bacteriol* 190(6): 1985–1996
- Amemura-Maekawa J, Mishima-Abe S, Kura F, Takahashi T, Watanabe H (1999) Identification of a novel periplasmic catalase-peroxidase KatA of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* 176(2): 339–344
- Amer AO, Byrne BG, Swanson MS (2005) Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes. *Autophagy* 1(1): 53–58
- Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, Brady G, Meshinchi S, Jagirdar R, Gewirtz A, Akira S, Nunez G (2006) Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* 281(46): 35217–35223
- Amor JC, Swails J, Zhu X, Roy CR, Nagai H, Ingmundson A, Cheng X, Kahn RA (2005) The structure of RalF, an ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor from *Legionella pneumophila*, reveals the presence of a cap over the active site. *J Biol Chem* 280(2): 1392–1400
- Aragon V, Kurtz S, Flieger A, Neumeister B, Cianciotto NP (2000) Secreted enzymatic activities of wild-type and *pilD*-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 68(4): 1855–1863
- Aravind L, Koonin EV (2000) The U box is a modified RING finger – a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* 10(4): R132–134
- Atlas RM (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* 1(4): 283–293
- Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* 3(2): 271–282
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86(2): 263–274
- Baldauf SL, Doolittle WF (1997) Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22): 12007–12012
- Bandyopadhyay P, Steinman HM (1998) *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the *katB* gene and studies of KatB function. *J Bacteriol* 180(20): 5369–5374

- Bandyopadhyay P, Steinman HM (2000) Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the *kata* gene and studies of KatA function. *J Bacteriol* 182(23): 6679–6686
- Bandyopadhyay P, Liu S, Gabbai CB, Venitelli Z, Steinman HM (2007) Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 75(2): 723–735
- Banga S, Gao P, Shen X, Fiscus V, Zong WX, Chen L, Luo ZQ (2007) *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12): 5121–5126
- Barker LP, Brooks DM, Small PL (1998) The identification of *Mycobacterium marinum* genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. *Mol Microbiol* 29(5): 1167–1177
- Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA (1990) Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med* 172(4): 1201–1210
- Benghezal M, Fauvarque MO, Tournebize R, Froquet R, Marchetti A, Bergeret E, Lardy B, Klein G, Sansonetti P, Charette SJ, Cosson P (2006) Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. *Cell Microbiol* 8(1): 139–148
- Berger KH, Isberg RR (1993) Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 7(1): 7–19
- Blaauw M, Linskens MH, van Haastert PJ (2000) Efficient control of gene expression by a tetracycline-dependent transactivator in single *Dictyostelium discoideum* cells. *Gene* 252(1–2): 71–82
- Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, Marchesi I, Bargellini A, Tato D, Napoli C, Zanetti F, Leoni E, Moro M, Scaltriti S, Ribera D'Alcala G, Santarpia R, Boccia S (2005) *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol* 71(10): 5805–5813
- Bozue JA, Johnson W (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* 64(2): 668–673

- Bozzaro S, Bucci C, Steinert M (2008) Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol* 271: 253–300
- Brazill DT, Meyer LR, Hatton RD, Brock DA, Gomer RH (2001) ABC transporters required for endocytosis and endosomal pH regulation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 114(Pt 21): 3923–3932
- Breiman RF, Butler JC (1998) Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives. *Semin Respir Infect* 13(2): 84–89
- Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann Intern Med* 90(4): 656–658
- Brombacher E, Urwyler S, Ragaz C, Weber SS, Kami K, Overduin M, Hilbi H (2009) Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J Biol Chem* 284(8): 4846–4856
- Bruggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppee JY, Buchrieser C (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 8(8): 1228–1240
- Brumell JH, Scidmore MA (2007) Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(4): 636–652
- Byrne B, Swanson MS (1998) Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* 66(7): 3029–3034
- Cazalet C, Rusniok C, Bruggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* 36(11): 1165–1173
- Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J, Buchrieser C (2008) Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res* 18(3): 431–441
- Cecconi F, Levine B (2008) The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell* 15(3): 344–357

- Ceymann A, Horstmann M, Ehses P, Schweimer K, Paschke AK, Steinert M, Faber C (2008) Solution structure of the *Legionella pneumophila* Mip-rapamycin complex. *BMC Struct Biol* 8: 17
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148): 802-805
- Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H (2005) Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 73(7): 4272-4280
- Charette SJ, Cosson P (2007) A LYST/beige homolog is involved in biogenesis of *Dictyostelium* secretory lysosomes. *J Cell Sci* 120(Pt 14): 2338-2343
- Chaumorcel M, Souquere S, Pierron G, Codogno P, Esclatine A (2008) Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* 4(1): 46-53
- Chen J, de Felipe KS, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Segal G, Shuman HA (2004) *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* 303(5662): 1358-1361
- Chen Y, Rodrick V, Yan Y, Brazill D (2005) PldB, a putative phospholipase D homologue in *Dictyostelium discoideum* mediates quorum sensing during development. *Eukaryot Cell* 4(4): 694-702
- Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A, Chou IC, Iannuccilli W, Ulz ME, Kim DH, Geringer-Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG, Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 305(5692): 1966-1968
- Chua J, Vergne I, Master S, Deretic V (2004) A tale of two lipids: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *Curr Opin Microbiol* 7(1): 71-77
- Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC (1989) A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun* 57(4): 1255-1262
- Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC (1990) A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J Infect Dis* 162(1): 121-126

- Cianciotto NP, Fields BS (1992) *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(11): 5188–5191
- Cianciotto NP (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* 291(5): 331–343
- Cirillo SL, Lum J, Cirillo JD (2000) Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 146 ( Pt 6): 1345–1359
- Clarke M, Kohler J, Heuser J, Gerisch G (2002) Endosome fusion and microtubule-based dynamics in the early endocytic pathway of *Dictyostelium*. *Traffic* 3(11): 791–800
- Clemens DL, Horwitz MA (1996) The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* 184(4): 1349–1355
- Coers J, Vance RE, Fontana MF, Dietrich WF (2007) Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol* 9(10): 2344–2357
- Conover GM, Derre I, Vogel JP, Isberg RR (2003) The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol* 48(2): 305–321
- Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R (1996) Cellular microbiology emerging. *Science* 271(5247): 315–316
- Cosson P, Soldati T (2008) Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr Opin Microbiol* 11(3): 271–276
- Coxon PY, Summersgill JT, Ramirez JA, Miller RD (1998) Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infect Immun* 66(6): 2905–2913
- Cullinane M, Gong L, Li X, Lazar-Adler N, Tra T, Wolvetang E, Prescott M, Boyce JD, Devenish RJ, Adler B (2008) Stimulation of autophagy suppresses the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* in mammalian cell lines. *Autophagy* 4(6): 744–753
- Cunha BA (2008) Atypical pneumonias: current clinical concepts focusing on Legionnaires' disease. *Curr Opin Pulm Med* 14(3): 183–194
- Daisy JA, Benson CE, McKittrick J, Friedman HM (1981) Intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* 143(3): 460–464

- de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Guggenheim R, Gerisch G (1991) Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J* 10(13): 4097-4104
- de Hostos EL, Rehfuess C, Bradtke B, Waddell DR, Albrecht R, Murphy J, Gerisch G (1993) *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol* 120(1): 163-173
- De Lozanne A, Spudich JA (1987) Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236(4805): 1086-1091
- Derre I, Isberg RR (2004a) *Legionella pneumophila* replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infect Immun* 72(5): 3048-3053
- Derre I, Isberg RR (2004b) Macrophages from mice with the restrictive Lgn1 allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 72(11): 6221-6229
- Devreotes PN, Zigmond SH (1988) Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Annu Rev Cell Biol* 4: 649-686
- Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, Pierron G, Codogno P (2006) NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* 281(41): 30373-30382
- Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J Clin Microbiol* 42(1): 458-460
- Dorer MS, Kirton D, Bader JS, Isberg RR (2006) RNA interference analysis of *Legionella* in *Drosophila* cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog* 2(4): e34
- Dorn BR, Dunn WA, Jr., Progulske-Fox A (2001) *Porphyromonas gingivalis* traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun* 69(9): 5698-5708
- Drozanski W (1956) Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol Pol* 5(3-4): 315-317
- Dubuisson JF, Swanson MS (2006) Mouse infection by *Legionella*, a model to analyze autophagy. *Autophagy* 2(3): 179-182
- Duhon D, Cardelli J (2002) The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil* 23(7-8): 803-808

- Edelstein PH, Edelstein MA (1993) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* serogroup 1 monoclonal antibody type 2 positive and negative bacteria. *Epidemiol Infect* 111(3): 499–502
- Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Lounsbury H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435(7038): 43–57
- Faix J, Kreppel L, Shaulsky G, Schleicher M, Kimmel AR (2004) A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res* 32(19): e143
- Fajardo M, Schleicher M, Noegel A, Bozzaro S, Killinger S, Heuner K, Hacker J, Steinert M (2004) Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology* 150(Pt 9): 2825–2835
- Farbrother P, Wagner C, Na J, Tunggal B, Morio T, Urushihara H, Tanaka Y, Schleicher M, Steinert M, Eichinger L (2006) *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cell Microbiol* 8(3): 438–456
- Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC, Smith HW (1978) Primary isolation media for Legionnaires' disease bacterium. *J Clin Microbiol* 8(3): 320–325
- Fields BS (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* 4(7): 286–290
- Fields BS, Benson RF, Besser RE (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15(3): 506–526



- Fischer G, Bang H, Mech C (1984) [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta* 43(10): 1101-1111
- Fischer G, Bang H, Ludwig B, Mann K, Hacker J (1992) Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity. *Mol Microbiol* 6(10): 1375-1383
- Fitzgeorge RB, Baskerville A, Broster M, Hambleton P, Dennis PJ (1983) Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. *J Hyg (Lond)* 90(1): 81-89
- Flieger A, Gong S, Faigle M, Deeg M, Bartmann P, Neumeister B (2000a) Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J Bacteriol* 182(5): 1321-1327
- Flieger A, Gongab S, Faigle M, Mayer HA, Kehrer U, Mussotter J, Bartmann P, Neumeister B (2000b) Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol Lett* 188(2): 129-133
- Flieger A, Gong S, Faigle M, Stevanovic S, Cianciotto NP, Neumeister B (2001) Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 183(6): 2121-2124
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 41(1): 9-16
- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 297(22): 1189-1197
- Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V (2003) *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5437-5442
- Galat A (2000) Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *Eur J Biochem* 267(16): 4945-4959
- Gao LY, Abu Kwaik Y (1999) Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun* 67(9): 4886-4894
- Gao LY, Kwaik YA (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 2(1): 79-90

- Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, Brown EJ (2004) A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol* 53(6): 1677-1693
- Garel JR, Baldwin RL (1973) Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(12): 3347-3351
- George JR, Pine L, Reeves MW, Harrell WK (1980) Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 11(3): 286-291
- Gleeson JG (2000) Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin. *Curr Opin Neurol* 13(2): 121-125
- Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Jr., Kassanoff I (1978) Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* 107(2): 149-160
- Glockner G, Albert-Weissenberger C, Weinmann E, Jacobi S, Schunder E, Steinert M, Hacker J, Heuner K (2008) Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J Med Microbiol* 298(5-6): 411-428
- Goosney DL, Celli J, Kenny B, Finlay BB (1999) Enteropathogenic Escherichia coli inhibits phagocytosis. *Infect Immun* 67(2): 490-495
- Gothel SF, Marahiel MA (1999) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55(3): 423-436
- Grant B, Greenwald I (1996) The *Caenorhabditis elegans sel-1* gene, a negative regulator of *lin-12* and *glp-1*, encodes a predicted extracellular protein. *Genetics* 143(1): 237-247
- Grogan A, Reeves E, Keep N, Wientjes F, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ, Segal AW (1997) Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J Cell Sci* 110 ( Pt 24): 3071-3081
- Guo K, Nichol R, Skehel P, Dormann D, Weijer CJ, Williams JG, Pears C (2001) A *Dictyostelium* nuclear phosphatidylinositol phosphate kinase required for developmental gene expression. *EMBO J* 20(21): 6017-6027
- Hagedorn M, Soldati T (2007) Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of *Dictyostelium* to *Mycobacterium marinum* infection. *Cell Microbiol* 9(11): 2716-2733

- Hagele S, Hacker J, Brand BC (1998) *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol Lett* 169(1): 51–58
- Hagele S, Kohler R, Merkert H, Schleicher M, Hacker J, Steinert M (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* 2(2): 165–171
- Hales LM, Shuman HA (1999) *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect Immun* 67(7): 3662–3666
- Hammer BK, Swanson MS (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* 33(4): 721–731
- Hampton RY, Gardner RG, Rine J (1996) Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell* 7(12): 2029–2044
- Harris E, Wang N, Wu W, Weatherford A, De Lozanne A, Cardelli J (2002) *Dictyostelium* LvsB mutants model the lysosomal defects associated with Chediak-Higashi syndrome. *Mol Biol Cell* 13(2): 656–669
- Hart PD, Young MR (1991) Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *J Exp Med* 174(4): 881–889
- Hayashi T, Miyake M, Fukui T, Sugaya N, Daimon T, Itoh S, Oku T, Tsuji T, Toyoshima S, Imai Y (2008) Exclusion of actin-binding protein p57/coronin-1 from bacteria-containing phagosomes in macrophages infected with *Legionella*. *Biol Pharm Bull* 31(5): 861–865
- He C, Song H, Yorimitsu T, Monastyrska I, Yen WL, Legakis JE, Klionsky DJ (2006) Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *J Cell Biol* 175(6): 925–935
- Heidtman M, Chen EJ, Moy MY, Isberg RR (2009) Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol* 11(2): 230–248
- Helbig JH, Ludwig B, Luck PC, Groh A, Witzleb W, Hacker J (1995) Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2(2): 160–165

- Helbig JH, Luck PC, Steinert M, Jacobs E, Witt M (2001) Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* 32(2): 83–88
- Hickey EK, Cianciotto NP (1994) Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila fur* gene. *Gene* 143(1): 117–121
- Hickey EK, Cianciotto NP (1997) An iron- and *fur*-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infect Immun* 65(1): 133–143
- Hilbi H (2006) Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cell Microbiol* 8(11): 1697–1706
- Hookey JV, N. A. Saunders, N. K. Fry, R. J. Birtles, and T. G. Harrison (1996) Phylogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *Int J Syst Bacteriol* 46: 526–531
- Horstmann M, Kamphausen T, Schweimer K, Steinert M, Hacker J, Haase A, Rosch P, Schweimer G, Faber C (2005) 1H, 13C, 15N backbone and sidechain resonance assignment of Mip(77–213) the PPIase domain of the *Legionella pneumophila* Mip protein. *J Biomol NMR* 31(1): 77–78
- Horwitz MA, Silverstein SC (1980) Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* 66(3): 441–450
- Horwitz MA (1983a) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 158(6): 2108–2126
- Horwitz MA (1983b) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 158(4): 1319–1331
- Horwitz MA (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36(1): 27–33
- Horwitz MA, Maxfield FR (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* 99(6): 1936–1943
- Howard PK, Ahern KG, Firtel RA (1988) Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res* 16(6): 2613–2623

- Hull SS, Jr., Kaiser L, Jaffe MD, Sparks HV, Jr. (1986) Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood Vessels* 23(4-5): 183-198
- Ingmundson A, Delprato A, Lambright DG, Roy CR (2007) *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* 450(7168): 365-369
- Insall R (2005) The *Dictyostelium* genome: the private life of a social model revealed? *Genome Biol* 6(6): 222
- Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* 7(1): 13-24
- Jepras RI, Fitzgeorge RB, Baskerville A (1985) A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)* 95(1): 29-38
- Jin T, Xu X, Hereld D (2008) Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 44(1): 1-8
- Jules M, Buchrieser C (2007) *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett* 581(15): 2829-2838
- Kagan JC, Stein MP, Pypaert M, Roy CR (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J Exp Med* 199(9): 1201-1211
- Kaplan J, De Domenico I, Ward DM (2008) Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol* 15(1): 22-29
- Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, Bennett JV, Skaliy P, Feeley JC, Anderson DC, Potter ME, Newhouse VF, Gregg MB, Brachman PS (1981) Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol* 114(3): 337-347
- Khoshnoodi J, Cartiailler JP, Alvares K, Veis A, Hudson BG (2006) Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem* 281(50): 38117-3812
- Kohler R, Fanghanel J, König B, Luneberg E, Frosch M, Rahfeld JU, Hilgenfeld R, Fischer G, Hacker J, Steinert M (2003) Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 71(8): 4389-4397

- Komano T, Yoshida T, Narahara K, Furuya N (2000) The transfer region of IncI1 plasmid R64: similarities between R64 *tra* and *legionella icm/dot* genes. *Mol Microbiol* 35(6): 1348–1359
- Kourtis N, Tavernarakis N (2009) Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* 16(1): 21–30
- Krinos C, High AS, Rodgers FG (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J Appl Microbiol* 86(2): 237–244
- Kubori T, Hyakutake A, Nagai H (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol Microbiol* 67(6): 1307–1319
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12–Apg5–Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 277(21): 18619–18625
- Kuspa A, Loomis WF (1992) Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18): 8803–8807
- Kypri E, Schmauch C, Maniak M, De Lozanne A (2007) The BEACH protein LysB is localized on lysosomes and postlysosomes and limits their fusion with early endosomes. *Traffic* 8(6): 774–783
- Lahteenmaki K, Edelman S, Korhonen TK (2005) Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol* 13(2): 79–85
- Lam-Yuk-Tseung S, Picard V, Gros P (2006) Identification of a tyrosine-based motif (YGSI) in the amino terminus of Nramp1 (Slc11a1) that is important for lysosomal targeting. *J Biol Chem* 281(42): 31677–31688
- Lam D, Golstein P (2008) A specific pathway inducing autophagic cell death is marked by an IP3R mutation. *Autophagy* 4(3): 349–350
- Lam D, Kosta A, Luciani MF, Golstein P (2008) The *inositol 1,4,5-trisphosphate* receptor is required to signal autophagic cell death. *Mol Biol Cell* 19(2): 691–700
- Legakis JE, Yen WL, Klionsky DJ (2007) A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy* 3(5): 422–432
- Levine B (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120(2): 159–162

- Levine B, Deretic V (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7(10): 767–777
- Li Z, Solomon JM, Isberg RR (2005) *Dictyostelium discoideum* strains lacking the RtoA protein are defective for maturation of the *Legionella pneumophila* replication vacuole. *Cell Microbiol* 7(3): 431–442
- Liles MR, Edelstein PH, Cianciotto NP (1999) The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 31(3): 959–970
- Liles MR, Scheel TA, Cianciotto NP (2000) Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 182(3): 749–757
- Liu Y, Luo ZQ (2007) The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. *Infect Immun* 75(2): 592–603
- Liu M, Conover GM, Isberg RR (2008) *Legionella pneumophila* EnhC is required for efficient replication in tumour necrosis factor alpha-stimulated macrophages. *Cell Microbiol* 10(9): 1906–1923
- Loomis WF, Smith DW (1990) Molecular phylogeny of *Dictyostelium discoideum* by protein sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(23): 9093–9097
- Losick VP, Isberg RR (2006) NF- $\kappa$ B translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* 203(9): 2177–2189
- Lu H, Clarke M (2005) Dynamic properties of *Legionella*-containing phagosomes in *Dictyostelium amoebae*. *Cell Microbiol* 7(7): 995–1007
- Lucas CE, Brown E, Fields BS (2006) Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiology* 152(Pt 12): 3569–3573
- Luck PC, Steinert M (2006) [Pathogenesis, diagnosis and therapy of *Legionella* infections]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 49(5): 439–449
- Machner MP, Isberg RR (2006) Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell* 11(1): 47–56
- Machner MP, Isberg RR (2007) A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* 318(5852): 974–977

- Mari M, Reggiori F (2007a) Shaping membranes into autophagosomes. *Nat Cell Biol* 9(10): 1125–1127
- Mari M, Reggiori F (2007b) Atg9 trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 3(2): 145–148
- Marra A, Shuman HA (1989) Isolation of a *Legionella pneumophila* restriction mutant with increased ability to act as a recipient in heterospecific matings. *J Bacteriol* 171(4): 2238–2240
- Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA (1992) Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9607–9611
- Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF (1994) Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med* 154(21): 2417–2422
- Martens H, Novotny J, Oberstrass J, Steck TL, Postlethwait P, Nellen W (2002) RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell* 13(2): 445–453
- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 297(22): 1197–1203
- Mercer J, Helenius A (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320(5875): 531–535
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2003a) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12–Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1679–1688
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2003b) Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 35(5): 553–561
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069–1075
- Mody CH, Paine R, 3rd, Shahrabadi MS, Simon RH, Pearlman E, Eisenstein BI, Toews GB (1993) *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J Infect Dis* 167(5): 1138–1145
- Molofsky AB, Swanson MS (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* 53(1): 29–40
- Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, Swanson MS (2006) Cytosolic recognition of flagellin by mouse



- macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med* 203(4): 1093–1104
- Murata T, Delprato A, Ingmundson A, Toomre DK, Lambright DG, Roy CR (2006) The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* 8(9): 971–977
- Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147(Pt 11): 3121–3126
- Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* 295(5555): 679–682
- Nellen W, Silan C, Firtel RA (1984) DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol* 4(12): 2890–2898
- Neuhaus EM, Almers W, Soldati T (2002) Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 13(4): 1390–1407
- Newton HJ, Sansom FM, Dao J, McAlister AD, Sloan J, Cianciotto NP, Hartland EL (2007) Sell repeat protein LpnE is a *Legionella pneumophila* virulence determinant that influences vacuolar trafficking. *Infect Immun* 75(12): 5575–5585
- Newton HJ, Sansom FM, Dao J, Cazalet C, Bruggemann H, Albert-Weissenberger C, Buchrieser C, Cianciotto NP, Hartland EL (2008) Significant role for *ladC* in initiation of *Legionella pneumophila* infection. *Infect Immun* 76(7): 3075–3085
- Ninio S, Roy CR (2007) Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol* 15(8): 372–380
- Niu H, Yamaguchi M, Rikihisa Y (2008) Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 10(3): 593–605
- Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y, Klionsky DJ (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* 148(3): 465–480
- Noegel AA, Schleicher M (2000) The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J Cell Sci* 113 ( Pt 5): 759–766
- O'Connell WA, Hickey EK, Cianciotto NP (1996) A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding. *Infect Immun* 64(3): 842–848

- Otto GP, Wu MY, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Hilbi H, Shuman HA, Kessin RH (2004) Macroautophagy is dispensable for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Microbiol* 51(1): 63–72
- Padh H, Lavasa M, Steck TL (1989) Prelysosomal acidic vacuoles in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* 108(3): 865–874
- Parent CA (2004) Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Curr Opin Cell Biol* 16(1): 4–13
- Payne NR, Horwitz MA (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* 166(5): 1377–1389
- Pearlman E, Jiwa AH, Engleberg NC, Eisenstein BI (1988) Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. *Microb Pathog* 5(2): 87–95
- Peracino B, Wagner C, Balest A, Balbo A, Pergolizzi B, Noegel AA, Steinert M, Bozzaro S (2006) Function and mechanism of action of *Dictyostelium* Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection. *Traffic* 7(1): 22–38
- Philips JA (2008) Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. *Cell Microbiol* 10(12): 2408–2415
- Pizarro-Cerda J, Cossart P (2004) Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nat Cell Biol* 6(11): 1026–1033
- Polesky AH, Ross JT, Falkow S, Tompkins LS (2001) Identification of *Legionella pneumophila* genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* 69(2): 977–987
- Pope CD, O'Connell W, Cianciotto NP (1996) *Legionella pneumophila* mutants that are defective for iron acquisition and assimilation and intracellular infection. *Infect Immun* 64(2): 629–636
- Pukatzki S, Kessin RH, Mekalanos JJ (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 3159–3164
- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1528–1533

- Purdy GE, Owens RM, Bennett L, Russell DG, Butcher BA (2005) Kinetics of phosphatidylinositol-3-phosphate acquisition differ between IgG bead-containing phagosomes and *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes. *Cell Microbiol* 7(11): 1627-1634
- Qing G, Yan P, Xiao G (2006) Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of IkappaB kinase (IKK). *Cell Res* 16(11): 895-901
- Quinn FD, Tompkins LS (1989) Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities. *Mol Microbiol* 3(6): 797-805
- Ragaz C, Pietsch H, Urwyler S, Tiaden A, Weber SS, Hilbi H (2008) The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cell Microbiol* 10(12): 2416-2433
- Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S (2000) Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science* 288(5470): 1436-1439
- Raper KB (1935) *Dictyostelium discoideum*, A new species of slime mold form decaying forest leaves. *J Agr Research* 55: 135-147
- Raper KB, Smith NR (1939) The Growth of *Dictyostelium discoideum* upon Pathogenic Bacteria. *J Bacteriol* 38(4): 431-445
- Rauchenberger R, Hacker U, Murphy J, Niewohner J, Maniak M (1997) Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol* 7(3): 215-218
- Rehberg M, Kleylein-Sohn J, Faix J, Ho TH, Schulz I, Graf R (2005) Dictyostelium LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. *Mol Biol Cell* 16(6): 2759-2771
- Riboldi-Tunncliffe A, König B, Jessen S, Weiss MS, Rahfeld J, Hacker J, Fischer G, Hilgenfeld R (2001) Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat Struct Biol* 8(9): 779-783
- Robinson CG, Roy CR (2006) Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 8(5): 793-805
- Robinson N, Wolke M, Ernestus K, Plum G (2007) A mycobacterial gene involved in synthesis of an outer cell envelope lipid is a key factor in prevention of phagosome maturation. *Infect Immun* 75(2): 581-591

- Rogers J, Keevil CW (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol* 58(7): 2326–2330
- Rossier O, Cianciotto NP (2001) Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 69(4): 2092–2098
- Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33(12): 1179–1183
- Rowbotham TJ (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* 22(9): 678–689
- Ruehlemann SA, Crawford GR (1996) Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. *Med J Aust* 164(1): 36–38
- Rupper A, Cardelli J (2001) Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* 1525(3): 205–216
- Rupper A, Grove B, Cardelli J (2001) Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 114(Pt 13): 2449–2460
- Rybakin V, Rastetter RH, Stumpf M, Uetrecht AC, Bear JE, Noegel AA, Clemen CS (2008) Molecular mechanism underlying the association of Coronin-7 with Golgi membranes. *Cell Mol Life Sci* 65(15): 2419–2430
- Rybakin V, Stumpf M, Schulze A, Majoul IV, Noegel AA, Hasse A (2004) Coronin 7, the mammalian POD-1 homologue, localizes to the Golgi apparatus. *FEBS Lett* 573(1–3): 161–167
- Sadosky AB, Wilson JW, Steinman HM, Shuman HA (1994) The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *J Bacteriol* 176(12): 3790–3799
- Sansom FM, Newton HJ, Crikis S, Cianciotto NP, Cowan PJ, d'Apice AJ, Hartland EL (2007) A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 9(8): 1922–1935
- Schreiner T, Mohrs MR, Blau-Wasser R, von Krempelhuber A, Steinert M, Schleicher M, Noegel AA (2002) Loss of the F-actin binding and vesicle-associated protein comitin leads to a phagocytosis defect. *Eukaryot Cell* 1(6): 906–914

- Segal G, Shuman HA (1998) Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 30(1): 197–208
- Sekito T, Kawamata T, Ichikawa R, Suzuki K, Ohsumi Y (2009) Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes Cells* 14: 525–538
- Shina MC, Noegel AA (2008) Invertebrate coronins. *Subcell Biochem* 48: 88–97
- Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306(5698): 990–995
- Skriwan C, Fajardo M, Hagele S, Horn M, Wagner M, Michel R, Krohne G, Schleicher M, Hacker J, Steinert M (2002) Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol* 291(8): 615–624
- Solomon JM, Isberg RR (2000) Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 8(10): 478–480
- Solomon JM, Leung GS, Isberg RR (2003) Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host coronin. *Infect Immun* 71(6): 3578–3586
- Somesh BP, Neffgen C, Iijima M, Devreotes P, Rivero F (2006) *Dictyostelium* RacH regulates endocytic vesicular trafficking and is required for localization of vacuolin. *Traffic* 7(9): 1194–1212
- Souza GM, Mehta DP, Lammertz M, Rodriguez-Paris J, Wu R, Cardelli JA, Freeze HH (1997) *Dictyostelium* lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci* 110 ( Pt 18): 2239–2248
- St John G, Steinman HM (1996) Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival. *J Bacteriol* 178(6): 1578–1584
- Stamm LM, Brown EJ (2004) *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium. *Microbes Infect* 6(15): 1418–1428
- Steele TW (1989) Legionnaires' disease in South Australia, 1979–1988. *Med J Aust* 151(6): 322, 325–326, 328
- Steinert M, Hentschel U, Hacker J (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* 26(2): 149–162

- Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glockner G (2007) *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol* 297(7-8): 577-587
- Stone BJ, Abu Kwaik Y (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* 66(4): 1768-1775
- Sturgill-Koszycki S, Swanson MS (2000) *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med* 192(9): 1261-1272
- Sultana H, Rivero F, Blau-Wasser R, Schwager S, Balbo A, Bozzaro S, Schleicher M, Noegel AA (2005) Cyclase-associated protein is essential for the functioning of the endo-lysosomal system and provides a link to the actin cytoskeleton. *Traffic* 6(10): 930-946
- Sultana H, Neelakanta G, Eichinger L, Rivero F, Noegel AA (2009) Microarray phenotyping places cyclase associated protein CAP at the crossroad of signaling pathways reorganizing the actin cytoskeleton in *Dictyostelium*. *Exp Cell Res* 315(2): 127-140
- Suzuki K, Nishihata J, Arai Y, Honma N, Yamamoto K, Irimura T, Toyoshima S (1995) Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif. *FEBS Lett* 364(3): 283-288
- Swanson MS, Isberg RR (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* 63(9): 3609-3620
- Swanson MS, Hammer BK (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 54: 567-613
- Swanson MS, Sturgill-Koszycki I (2000) Exploitation of macrophages as a replication niche by *Legionella pneumophila*. *Trends Microbiol* 8(2): 47-49
- Swanson MS, Fernandez-Moreira E (2002) A microbial strategy to multiply in macrophages: the pregnant pause. *Traffic* 3(3): 170-177
- Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(8): 639-649
- Tachado SD, Samrakandi MM, Cirillo JD (2008) Non-opsonic phagocytosis of *Legionella pneumophila* by macrophages is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *PLoS ONE* 3(10): e3324
- Tesh MJ, Miller RD (1981) Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. *J Clin Microbiol* 13(5): 865-869

- Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* 114(Pt 24): 4637–4650
- Tobin DM, Ramakrishnan L (2008) Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 10(5): 1027–1039
- Tonjum T, Welty DB, Jantzen E, Small PL (1998) Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, and *M. haemophilum*: mapping of their relationships to *M. tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNA–DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J Clin Microbiol* 36(4): 918–925
- Traincard F, Ponte E, Pun J, Coukell B, Veron M (1999) Evidence for the presence of an NF- $\kappa$ B signal transduction system in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* 112 ( Pt 20): 3529–3535
- Tsai TF, Finn DR, Plikaytis BD, McCauley W, Martin SM, Fraser DW (1979) Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med* 90(4): 509–517
- Veltman DM, Keizer–Gunnik I, Van Haastert PJ (2008) Four key signaling pathways mediating chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* 180(4): 747–753
- Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S, Abu Kwaik Y (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J Exp Med* 186(4): 537–547
- Vergne I, Chua J, Deretic V (2003) *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic* 4(9): 600–606
- Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11): 4033–4038
- Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, Hocke AC, Zahlten J, Slevogt H, N'Guessan P D, Gunther S, Schmeck B, Hippenstiel S, Flieger A, Suttorp N, Opitz B (2008) NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol* 180(10): 6808–6815
- Viswanathan VK, Edelstein PH, Pope CD, Cianciotto NP (2000) *The Legionella pneumophila iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infect Immun* 68(3): 1069–1079

- Viswanathan VK, Kurtz S, Pedersen LL, Abu-Kwaik Y, Krcmarik K, Mody S, Cianciotto NP (2002) The cytochrome c maturation locus of *Legionella pneumophila* promotes iron assimilation and intracellular infection and contains a strain-specific insertion sequence element. *Infect Immun* 70(4): 1842–1852
- Vlahou G, Rivero F (2006) Rho GTPase signaling in *Dictyostelium discoideum*: insights from the genome. *Eur J Cell Biol* 85(9–10): 947–959
- Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279(5352): 873–876
- Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL (2008) The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8(8): 607–618
- Wagner C, Khan AS, Kamphausen T, Schmausser B, Unal C, Lorenz U, Fischer G, Hacker J, Steinert M (2007) Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell Microbiol* 9(2): 450–462
- Ward DM, Griffiths GM, Stinchcombe JC, Kaplan J (2000) Analysis of the lysosomal storage disease Chediak-Higashi syndrome. *Traffic* 1(11): 816–822
- Warren WJ, Miller RD (1979) Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J Clin Microbiol* 10(1): 50–55
- Watarai M, Derre I, Kirby J, Gowney JD, Dietrich WF, Isberg RR (2001) *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med* 194(8): 1081–1096
- Watts DJ, Ashworth JM (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* 119(2): 171–174
- Weber SS, Ragaz C, Reus K, Nyfeler Y, Hilbi H (2006) *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog* 2(5): e46
- Weber SS, Ragaz C, Hilbi H (2009) The inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL1 restricts intracellular growth of *Legionella*, localizes to the replicative vacuole and binds to the bacterial effector LpnE. *Cell Microbiol* 11(3): 442–460
- Wessels D, Srikantha T, Yi S, Kuhl S, Aravind L, Soll DR (2006) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene encodes an RNA-binding



- protein that localizes to the pseudopod of *Dictyostelium* amoebae during chemotaxis. *J Cell Sci* 119(Pt 2): 370–379
- Williams RS, Boeckeler K, Graf R, Muller–Taubenberger A, Li Z, Isberg RR, Wessels D, Soll DR, Alexander H, Alexander S (2006) Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med* 12(9): 415–424
- Wintermeyer E, Ludwig B, Steinert M, Schmidt B, Fischer G, Hacker J (1995) Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect Immun* 63(12): 4576–4583
- Wong MC, Ewing EP, Jr., Callaway CS, Peacock WL, Jr. (1980) Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in cultured human embryonic lung fibroblasts. *Infect Immun* 28(3): 1014–1018
- Xiao G (2007) Autophagy and NF- $\kappa$ B: fight for fate. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(3–4): 233–243
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ (2008) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19(8): 3290–3298
- Yen WL, Klionsky DJ (2007) Atg27 is a second transmembrane cycling protein. *Autophagy* 3(3): 254–256
- Yen WL, Klionsky DJ (2008) How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)* 23: 248–262
- Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, Kuida K, Mariathasan S, Dixit VM, Flavell RA, Dietrich WF, Roy CR (2006) The Bircle cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol* 7(3): 318–325
- Zhao Y, Wilson D, Matthews S, Yap GS (2007) Rapid elimination of *Toxoplasma gondii* by gamma interferon-primed mouse macrophages is independent of CD40 signaling. *Infect Immun* 75(10): 4799–4803
- Zusman T, Aloni G, Halperin E, Kotzer H, Degtyar E, Feldman M, Segal G (2007) The response regulator PmrA is a major regulator of the *icm/dot* type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol Microbiol* 63(5): 1508–1523

## VII. ANHANG

### 1. Abkürzungen und Einheiten

---

A/mA	Ampere/Millampere
Abb.	Abbildung
ACES	N-2-Acetoamido-2-aminoethansulfonsäure
ad	auffüllen auf
BCYE	buffered charcoal yeast extract
°C	Grad Celcius
cfu	„colony forming units“
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
dest.	destiliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
g/mg/µg	Gramm/Milligramm/Mikrogramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung ( $\sim 9,81 \text{ m/s}^2$ )
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>k.o.</i>	knock out
$k_{\text{obs}}$	beobachtete (observed) Geschwindigkeitskonstante
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M/mM/µM	Molar/Millimolar/Mikromolar
m/v	Massenverhältnis für wässrige Lösungen von Feststoffen
µm	Mikrometer
min	Minute(n)
MOI	„multiplicity of infection“
MΦ	Makrophage(n)
M.Sc.	Master of Sciences
OD	optische Dichte
RT	Raumtemperatur
s.a.	siehe auch
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp

## 2. Aminosäuresequenzen der Collagen IV $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Isoformen

### Collagen IV $\alpha 1$ (gi|119629514|gb|EAX09109.1|)

MGPRLSVWLLLLPAALLLHEEHSRAAAKGGCAGSGCGKCDCHGVKGQKGERGLPGLQGVIGFPGMQGPEG  
PQGPPGQKGDGTGEPGLPGTKGTRGPPGASGYPGNPGLPGIPGQDGPFGPPGIPGCNGTKGERGFLGPPGL  
PGFAGNPGPPGLPGMKGDPGEILGHVPGMLLKGERGFPGIPGTPGPPGLPGLQGPVGPFGFTGPPGPPGP  
PGPPGEKGMGLSFQGPKGDKGDQGVSGPPGVPGQAQVQEKGDFATKGEKGQKGEPPGQMPGVGEKGE  
GKPGPRGKPGDKGDKGEKSGPGFPGEPGYPLIGRQGPQGEKGEAGPPGPPGIVIGTGPLGEKGERGYPG  
TPGPRGEPGPKGFPLPGQPGPPGLPVPGQAGAPGFPGERGEKGRGFPGTSLPGPSGRDGLPGPPGSPG  
PPGQPGYTNGIVECQPGPPGDQGPPIPGQPGFIFEIGEKGQKGESCLICDIDGYRGPFGPPGQPPGEIGF  
PGQPGAQKDRGLPGRDGVAGVPGPQGTPLIGQPGAKEPGEFYFDLRLKGDGDPGFPQPGMPGRAGS  
PGRDGHPLPGPKGSPGSGVLKGERGPPGGVGFPGSRGDTGPPGPPGYGPAGPIGDKQAGFPGGPGSPG  
LPGPKGEPGKIVPLPGPPGAEGPLPGSPGFPGPQDGRGFPGTGPRPLPGEKGAVGQPGIGFPGPPGPKGV  
DGLPGDMGPPGTGPRPGFNGPLPGNPVGQKGEFVGVLPLGLKGLPLPGIPGTGPEKKSIGVPGVPGEHG  
AIGPPGLQGIERGEPPGGLPGSVGSPGVPIGPPGARGPPGGQPPGLSGPPGKGEKGFPGFPLDMFG  
PKGDKAQGLPGITGQSGPLPGQQAQAPGIPGFPKSGEMGMVMTGPGQPGSPGVGAPGLPGEKGDHGF  
PGSSGPRGDPGLKGDGKDVGLPGKPGSMDKVDMSGMKQKGDQGEKGQIGPIGEKSGRGDPGTGVPKGK  
GQAGQPGQPGPKGDPGISGTPGAPGLPGPKGSGVGMGLPGTPGEKGVPIPGPQGSPLPGDKGAKGEKG  
QAGPPGIGIPGLRGEKGDQGIAGFPSPGPEKGEKKSIGIPGMPSPLGKSPGSGVPGSPGLPGEKGD  
GLPGLDGI PGVKGEAGLPGTPGTGPAQKGEPSDGI PGSAGEKEPGLPGRGFPGFPAKGDGKSGKE  
VGFPGLAGSPGIPGSKGEQGFMGPPPGQGPGLPGSPGHATEGPKGDRGPQGPGLPLPGMPGPPGLPG  
IDGVKGDKNPGWPGAPGVPGPKGDPGFQGMPIGGSPGITGSKGDMGPPGVPGFQGPGLPLQGIKGD  
QGDQGVPAKGLPGPPGPPGPDYDIKGEPLPGPEGPPGLKGLQGLPGPKGQGVTVGLVPIPGPPGIPGF  
DGAPGQKGEPMGAPGTGPRGFPGPPGPDGLPGSMGPPGTSPVDHGFVTRHSQTIDDPQCPSTKILYHG  
YSLLYVQGNERRAHQDLGTAGSCLRKFTSTMPFLFCNINNVCFASRNDYSYWLSTPEPMPMSMAPITGEN  
IRPFIISRCVCEAPAMVMAVHSQTIQIPPCPSGWSSSLWIGYSFVMHTSAGAEGSGQALASPGSCLEEF  
RSPFIECHGRGTCNYYANAYSFWLATIERSEMFKKPTSTLKAELRTHVSRQVCMRRT

### Collagen IV $\alpha 2$ (gi|116256354|ref|NP\_001837.2|)

MGRDQRAVAGPALRRWLLLTGTVTGFLAQSVLAGVKKFDVPCGGRDCSGGCQCYPEKGGRGQPGVPGPQ  
YNGPPGLQGFPLQGRKGDKGERGAPGVTGPKGDVGARGVSGFPAGDGI PGHFGQGGPRGRPGYDGCNGT  
QGDSPGQGPFGSEFTGPPGPQGPKGQKGEPIALPKEERDRYRGEPEGLVGFQGPGRPGHVGMGPV  
GAPGRPGPPGPPGPKGQGNRGLGFYGVKGEKGDVGQPGPNGIPSDTLHPIIAPTGVTFHPDQYKGEKGS  
EGEPGIRGISLKGEEGIMGFPLRGYPGLSSEKSGPGQKSGRGLDGYQGPDPGRGPKGEAGDPGPPGLPA  
YSPHPSLAKGARGDPGFGAQQGEPGSQGEPPGDPGLPGPPGLSIGDGDQRRGLPGEMGPKGFIDPGIPAL  
YGGPPGPDGKRGPFGPPGLPGPPGPDGFLFGLKGAAGRAGFPGLPGSPGARGPKGWKGDAECECTEGDE  
AIKGLPLPLPGPKGFAGINGEPGRKGRDGPQHGHLPGFPLGKGVPGNIGAPGPKAKGDSRTITTKGERG  
QPGVPGVPGMKGDDGSPGRDGLDGFPLPGPPGDGIKPPGDPGYPIPGTKGTPGEMGPPGLPLGLKG  
QRGFPGDAGLPGPPGFLGPPGPAGTPGQIDCDTIDVKRAVGGDRQEAIQPGCIGGPKGLPLPGPPGPTGA  
KGLRGIPGFAGADGGPGPRGLPGDAGREGFPGPFGFIPRGSKGAVGLPGPDGSPGPIGLPGPDGPPGER  
GLPGEVLGAQPGPRGDAGVPGPQPLKGLPGDRGPPGFRGSQGMPPGPKGQPLPGPSGQPGLYGPPGL  
HGFPGAPGQEGPLPLPGIPGREGLPGDRGPDGTGAPGVGMKGLSGDRGDAGFTGEQGHGPGSPGFKGID  
GMPGTPLKGRGSPGMDGFQGMPLKGRPGFPGSKGEAGFFGIPGLKGLAGEPGFKGSRGDPGPPGPP  
VILPGMKDIKGEKGDEGPMGLKGYLGAKGIQGMPIGPLSGIPGLPGRPGHIKGVKGDIGVPGIPGLPGF  
PGVAGPPGITGFPFGISRGDKGAPGRAGLYGEIGATGDFDIDGTINLPGRPLKGERGTTGIPGLKGF  
FGEKGTEDIGFPGITGVTGVQGPPLKGTGFPGLTGPPGSQGELGRIGLPGGKGDGWPGAPGLPGFP  
GLRGIRGLHGLPGTKGFPSPGSDIHGDPGFPGPGERGDPGEANTLPGVPVPGQKGDQAGPGERGPPG  
SPGLQGFPGITPPSNISGAPGDKGAPGIFGLKGYRGPPGPPGSAALPGSKGDTGNPGAPGTPGTGWAGD  
SGPQGRPGVFGPLPGEKGRGEQGFMGNTGPTGAVGDRGPKGPKGDPGFPAGPTVGAPGPIAGIPQKIAVQ  
PGTVGPPGRRGPPGAPGEMGPQGPPEPGFRGAPGKAGPQGRGVSAVPGFRGDEGPIGHQGPPIQGEAP  
GRGSPGLGMPGPRSVSIGYLLVKHSQTDQEPMPVGMNKLWSGYSLLYFEGQEKAHNQDLGLAGSCLAR  
FSTMPFLYCNPGDVCYYASRNDKSYWLSTTAPLPMPVAEDEIKPYISRCVCEAPAIAIAVHSQDVSIP  
HCPAGWRSWLWIGYSFLMHTAAGDEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFIECNGGRGTCHYYANKYSFWLT  
TIP EQSFQGSPTSADTLKAGLIRTHISRCQVCMKNL

### 3. Lebenslauf mit Publikationsliste

---

**Persönliche Daten:**

Name: Can Murat ÜNAL

Geburtsdatum: 29.07.1980

Geburtsort: Bursa/Türkei

Staatsangehörigkeit: deutsch/türkisch

Familienstand: ledig

Sprachen: Deutsch, Türkisch (beide Muttersprachen),  
Englisch (fließend)

**Schulausbildung:**

1986–1991 Grundschole in Istanbul, Türkei

1991–1999 Besuch des Gymnasiums der Deutschen Schule  
Istanbul, Türkei

Schulabschluss: Abitur

**Studium:**

1999–2004 Studium der Biologie, Bayerische Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg

2003–2004 Diplomarbeit am Institut für Molekulare  
Infektionsbiologie

Thema: Funktionelle Charakterisierung einer  
Metagenom-bank des Mittelmeerschwammes  
*Aplysina aerophoba*

Betreuerin: Prof. Dr. Ute Hentschel

Abschluss: Diplom-Biologe

**Promotion:**

2004 Beginn der Promotionsarbeit  
am Institut für Molekulare Infektionsbiologie,  
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Thema Molekulare Interaktion des *Legionella* Mip-  
Proteins mit Collagen IV und Analyse  
infektionsspezifischer Wirtsfaktoren mit Hilfe von  
*Dictyostelium discoideum*

Betreuer: Prof. Dr. Michael Steinert, TU  
Braunschweig (seit April 2007)

### Vorabpublikationen in Fachzeitschriften

Wagner C, Khan AS, Kamphausen T, Schmausser B, **Ünal C**, Lorenz U, Fischer G, Hacker J, Steinert M (2007) Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell Microbiol* **9**(2): 450–462

**Ünal C**, Steinert M (2006) *Dictyostelium discoideum* as a model to study host-pathogen interactions. *Methods Mol Biol* **346**: 507–515

### Publikationen in Vorbereitung

**Ünal, C**, Schwedhelm, KF, Thiele, A, Frese, F, Weiwald, M, Gunther, F, Hacker, J, Faber, C, Steinert, M. Identification of a Mip binding sequence in Collagen IV and optimization towards a peptide inhibitor

Shina, MC, **Ünal, C**, Müller-Taubenberger, A, Schleicher, M, Steinert, M, Noegel, A. The *Dictyostelium* Pod-1 homolog CRN7 has roles in actin-driven processes and infection with *Legionella pneumophila*

### Buchbeitrag

Steinert M, Wagner C, Fajardo M, Shevchuk, O, **Ünal C**, Galka F, Heuner K, Eichinger L, and Bozzaro S (2006) The Amoeba *Dictyostelium discoideum* Contributes to *Legionella* Infection. In *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. Eds.: Cianciotto, N. P., Abu Kwaik, Y., Edelstein, P. H., Fields, B. S., Geary, D. F., Harrison, T. G., Joseph, C. A., Ratcliff, R. M., Stout, J. E., Swanson, M. S. ASM Press, Washington DC, USA: 390–394

### Tagungsbeiträge

**Ünal C**, Wagner C, Khan AS, Faber C, Fischer G, Hacker J, Steinert M, Molecular understanding of Mip–Collagen interaction and implications for drug development. Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Oktober 2007, Hamburg (**Poster**)

Steinert M, Shevchuk O, **Ünal C**, Galka F, Wagner C, Fajardo M, Farbrother P, Eichinger L, Bozzaro *Dictyostelium* as host model for *Legionella* pathogenesis. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, März 2006, Jena (**Poster**)

**Ünal C**, Mip: a new target for anti-invasive therapy. New Trends in Infectious Disease Research, Second Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB544 and SFB630, November 2006, Heidelberg (**Vortrag**)

**Ünal C**, A collagen derived peptide inhibits Mip- a PPIase of *Legionella pneumophila*. Minisymposium on Biochemistry of Host-Pathogen Interactions, November 2007 Wittenberg (**Vortrag**)

**Ünal C**, New findings on a collagen derived peptide inhibiting Mip- a PPIase of *Legionella pneumophila*. Minisymposium on Biochemistry of Host-Pathogen Interactions, Januar 2009, Kloster Banz (**Vortrag**)